

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. September 2003 (25.09.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/078629 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12N 15/11, 15/82**

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP03/02735**

(22) Internationales Anmeldedatum:
17. März 2003 (17.03.2003)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
102 12 892.8 20. März 2002 (20.03.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE/DE]; Carl-Bosch-Strasse 38, 67056 Ludwigshafen (DE).**

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **KOCK, Michael [DE/DE]; Am Leutbusch 12, 67105 Schifferstadt (DE). BAUER, Jörg [DE/DE]; Friedrich-Profit-Str. 56, 67063 Ludwigshafen (DE).**

(74) Anwalt: **DÖRPER, Thomas; BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).**

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 03/078629 A1

(54) **Titel:** CONSTRUCTS AND METHODS FOR THE REGULATION OF GENE EXPRESSION

(54) **Bezeichnung:** KONSTRUKTE UND VERFAHREN ZUR REGULATION DER GENEXPRESSION

(57) **Abstract:** The invention relates to constructs and methods for the regulation of gene expression of at least two endogenous target genes by introduction of an at least partly double-stranded ribonucleic acid molecule into a eukaryotic cell or a eukaryotic organism, whereby the ribonucleic acid molecule comprises at least two ribonucleotide sequence sections which are homologous with various genes of the eukaryotic cell.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft Konstrukte und Verfahren zur Regulation der Genexpression von mindestens zwei endogenen Zielgenen durch Einbringen eines zumindest teilweise doppelsträngigen Ribonukleinsäuremoleküls in eine eukaryotische Zelle oder einen eukaryotischen Organismus, wobei das Ribonukleinsäuremolekül mindestens zwei Ribonukleotidsequenzabschnitte umfasst, die zu verschiedenen Genen der eukaryotischen Zelle homolog sind.

Konstrukte und Verfahren zur Regulation der Genexpression

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft Konstrukte und Verfahren zur Regulation der Genexpression von mindestens zwei endogenen Zielgenen durch Einbringen eines zumindest teilweise doppelsträngigen Ribonukleinsäuremoleküls in eine eukaryotische Zelle oder einen 10 eukaryotischen Organismus, wobei das Ribonukleinsäuremolekül mindestens zwei Ribonukleotidsequenzabschnitte umfasst, die zu verschiedenen Genen der eukaryotischen Zelle homolog sind.

Die gezielte Inhibition der Genexpression definierter Gene ist 15 eine der am meisten beforschten Technologie der Biotechnologie. Die Expression von antisense-RNA ist dabei der am häufigsten verwendet Ansatz und vielfach beschrieben (u.a. EP-A1 0 458 367; EP-A1 0 140 308; van der Krol AR et al. (1988) BioTechniques 6(10):658-676; de Lange P et al. (1995) Curr Top Microbiol Immunol 197:57-75). Antisense-RNA vermittelte Ansätze haben jedoch 20 den Nachteil, dass stöchiometrische Mengen der antisense-RNA erforderlich sind, um eine wirksame Inhibition der Ziel-mRNA zu bewirken. Weitere Probleme stehen im Zusammenhang mit dem Einbringen der antisense-RNA in ausreichenden Mengen in die Zellen und 25 mit der Labilität der antisense-RNA. Ansätze basierend auf antisense-RNA sind daher meist ineffizient.

Ein weiterer Ansatz zur Genregulation ist die "Co-Suppression" und meint die Verminderung der Expression eines endogenen Zielgens 30 durch transgene Expression einer sense-RNA dieses Zielgens (EP-A1 0 465 572). Der Co-Suppression liegen vermutlich mehr als ein Mechanismus zugrunde. Nachteilig ist die mangelnde Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit des Verfahrens. In manchen Fällen erfolgt Suppression, während in anderen Fällen - bedingt durch 35 die Expression der sense-RNA - die erwartete Überexpression erfolgt. Auch ist der erhaltene Phänotyp oft nicht stabil. Die Anwendung der Co-Suppression ist im wesentlichen auf Pflanzen beschränkt.

40 Verschiedene Abwandlungen der Verfahren basierend auf antisense-RNA oder Cosuppression sind bekannt. So beschreibt WO 93/23551 ein Verfahren zur Inhibition mehrerer Gene durch Expression einer chimären antisense-RNA oder sense-RNA. Das Verfahren kann die üblichen mit antisense-RNA oder sense-RNA verbundenen Probleme nicht lösen und bleibt ineffizient.

45

WO 98/36083 und WO 99/15682 beschreiben die Regulation der Genexpression mittels viraler Expressionssysteme ("virus induced gene

silencing" VIGS).

WO 99/32619 und WO 99/53050 beschreiben Verfahren zur Inhibition einzelner Zielgene unter Verwendung einer RNA mit doppelsträngiger Struktur, wobei das Zielgen und die Region der RNA Duplex zumindest eine teilweise Identität aufweisen (siehe auch: Montgomery MK et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95:15502- 15507; Sharp PA (1999) Genes & Development 13(2):139-141; Fire A et al. (1998) Nature 391:806-11). Das Verfahren wird heute auch als 10 "RNA-Interference" (RNAi) bezeichnet und hat in Mechanismus und Wirkung Ähnlichkeiten mit dem oben erwähnten VIGS Verfahren.

Die beschriebenen Verfahren, insbesondere das RNAi-Verfahren, lösen zwar einige Probleme im Zusammenhang mit der Verminderung 15 einzelner Zielgene. Für andere Probleme, insbesondere für die parallele Suppression mehrerer Zielgene, konnte jedoch bislang keine befriedigende Lösung bereit gestellt werden. Zahlreiche Ansätze in der Biotechnologie erfordern nicht nur die Verminderung eines einzelnen Zielgens, sondern mehrerer Zielgene, wie beispielsweise verschiedener Gene eines oder verschiedener Stoffwechselwege oder ganzer Genfamilien. Bislang war dies nur mit erheblichen Arbeits- und Zeitaufwand zu realisieren. Die Ansätze 20 erforderten oft die individuelle Regulation der einzelnen Zielgene durch sukzessive Transformation beispielsweise mit verschiedenen Expressionskonstrukten, die jeweils für eine antisense RNA eines Zielgens kodierten. Neben dem erheblichen Arbeits- und Zeitaufwand, besteht dabei der Nachteil, das für viele Systeme 25 und Organismen nur eine beschränkte Anzahl von Selektionsmarkern, geeigneten Promotoren etc. zur Verfügung steht, was multiple Transformationen erheblich erschwert und beispielsweise die Deletion 30 der Marker nach der Transformation und Selektion erfordert. Die mehrfache Verwendung eines Promotors hat oft unerwünschte Folgen, wie beispielsweise ein epigenetisches Gene-Silencing. Hierbei kommt es infolge der mehrfach verwendeten Kontrollsequenzen 35 zu einer Inaktivierung derselben, vergleichbar der oben beschriebenen Cosuppression.

Es stellte sich also die Aufgabe, neue Verfahren bereit zu stellen, die eine effiziente Verminderung der Expression mindestens zweier endogener Zielgene in einer eukaryotischen Zelle oder einem 40 eukaryotischen Organismus ermöglichen. Diese Aufgabe wird durch die vorliegende Erfindung gelöst.

Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft Verfahren zur Verminderung der Expression von mindestens zwei verschiedenen, endogenen Zielgenen in einer eukaryotischen Zelle oder einem eukaryotischen Organismus durch Einbringen eines zumindest teilweise doppelsträngigen Ribonukleinsäuremoleküls in besagte eukaryotische 45

Zelle oder besagten eukaryotischen Organismus, wobei das doppelsträngige Ribonukleinsäuremolekül umfasst

a) mindestens zwei "sense"-Ribonukleotidsequenzen, wobei jeweils
5 mindestens eine dieser "sense"-Ribonukleotidsequenzen im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines jeden der besagten endogenen Zielgene und

10 b) "antisense"-Ribonukleotidsequenzen, die zu besagten "sense"-Ribonukleotidsequenzen unter a) im wesentlichen komplementären sind.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung umfasst ein zumindest teilweise 15 doppelsträngiges Ribonukleinsäuremolekül, wobei das doppelsträngige Ribonukleinsäuremolekül umfasst

a) mindestens zwei "sense"-Ribonukleotidsequenzen, wobei jeweils mindestens eine dieser "sense"-Ribonukleotidsequenzen im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines endogenen Zielgens, wobei jedoch nicht alle "sense"-Ribonukleotidsequenzen zu dem "sense"-RNA-Transkript eines einzigen endogenen Zielgens identisch sind, und
20
25 b) "antisense"-Ribonukleotidsequenzen, die zu besagten "sense"-Ribonukleotidsequenzen unter a) im wesentlichen komplementären sind.

30 Umfasst ist ferner die Verwendung der erfindungsgemäßen doppelsträngiges Ribonukleinsäuremolekül in einem der erfindungsgemäßen Verfahren.

Die vorliegende Erfindung löst die oben geschilderten Probleme 35 und ermöglicht eine schnelle, besonders effiziente Methode zur Regulation der Expression verschiedener Zielgene. Insbesondere ergeben sich folgende Vorteile:

a) Transgene Organismen oder Zellen, in denen mehr als ein Zielgen 40 inhibiert wird, können in einer einzigen Transformation erzeugt werden.

b) Die Transkriptionsrate für jeden Ribonukleotidsequenz der dsRNA ist gleich. Dadurch werden multiple Phänotypen durch 45 unterschiedliche Expressionshöhen verhindert, wie sie bei individueller Expression separater Ribonukleotidsequenzen - beispielsweise durch den unterschiedlichen Ort der Insertion

in das Genom - oft entstehen. Dieser Vorteil gewährleistet eine gleichbleibend hohe Inhibition aller Zielgene und vermindert dramatisch die erforderlichen Selektionsschritte zu Generierung eines Organismus, bei dem alle Zielgene effizient 5 supprimiert werden.

- c) Ein ökonomischer Umgang mit Kontrollelementen wie Promotoren und Selektionsmarkern wird ermöglicht. Zudem erübrigen sich Probleme, wie sie bei der mehrfachen Verwendung eines bestimmten Kontrollelementes, insbesondere eines Promoters, entstehen können ("epigenic gene silencing").
- d) Eine Segregation der einzelnen Ribonukleotidsequenzen bei nachfolgenden Züchtungs- und Kreuzungsschritten, wie sie bei 15 der Verwendung mehrerer Expressionskonstrukte zwangsläufig entsteht, wird verhindert. Dadurch wird die nachfolgende Züchtung stabiler Linien erheblich erleichtert und beschleunigt.
- 20 e) Organismen mit komplexen beispielsweise polyploide Genomen, wie beispielsweise manche Pflanzen, sind einer effizienten Gensuppression zugänglich. Aufgrund der zahlreichen Kopien für einzelne Gene sind diese Organismen klassischen verfahren der Mutagenese und Selektion nicht zugänglich.

25 Überraschenderweise konnte bei dem erfindungsgemäßen Verfahren keine störende Interferenz zwischen den einzelnen Ribonukleotidsequenzabschnitte untereinander beobachtet werden.

30 "Endogenes Zielgen einer eukaryotischen Zelle oder eines eukaryotischen Organismus" meint jede Nukleinsäuresequenz in einer eukaryotischen Zelle, einem eukaryotischen Organismus oder einem Teil, Organ, Gewebe, Samen etc. desselben, die zur Transkription befähigt ist. Dabei kann es sich um natürlicherweise vorkommende oder 35 aber künstlich eingeführte Sequenzen (wie beispielsweise transgene Sequenzen) handeln, wobei natürlicherweise vorkommende Sequenzen bevorzugt sind. Natürlicherweise vorkommende Sequenzen sind bevorzugt und umfassen sowohl die eigenen Sequenzen der eukaryotischen Zelle oder des eukaryotischen Organismus als auch

40 Gene von Pathogenen, die in der eukaryotischen Zelle oder dem eukaryotischen Organismus nach einem Befall durch ein Pathogen präsent sind. Das Zielgen kann in der chromosomal DNA oder der DNA der Organellen (wie beispielsweise der Plastiden z.B. Chloroplasten etc.) lokalisiert sein oder aber sich extrachromosomal in

45 der Zelle befinden. Die natürlicherweise vorkommenden, eigenen Sequenzen des eukaryotischen Organismus umfassen bevorzugt Gene desselben, die stabil im Genom vorliegen, wobei das Genom die Ge-

samttheit der genetischen Information meint und sowohl die chromosomal als auch die plastidäre DNA umfasst. Bevorzugt ist das endogene Zielgen ein natürlicherweise in der chromosomal DNA vor kommendes Gen. Bevorzugt sind Gene deren verminderte Expression 5 zu einem veränderten Phänotyp führt.

"Verminderung" oder "vermindern" der Expression eines Zielgens ist im Zusammenhang weit auszulegen und umfasst die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Expression des Zielgens oder der von ihm abgeleiteten RNA, mRNA, rRNA, tRNA und/oder des dadurch kodierten Proteinproduktes in einer Zelle oder einem Organismus oder einem davon abgeleiteten Teil, Gewebe, Organ, Zelle oder Samen. Eine Verminderung im Sinne 10 der Erfindung umfasst die mengenmässige Verringerung einer vom Zielgen exprimierten RNA, mRNA, rRNA, tRNA und/oder des dadurch kodierten Proteinproduktes bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen derselben. Dabei wird die Expression einer bestimmten RNA, mRNA, rRNA, tRNA und/oder des dadurch kodierten 15 Proteinproduktes in einer Zelle oder einem Organismus im Vergleich zu der selben Zelle oder Organismus, die dem Verfahren nicht unterworfen wurden, bevorzugt um mehr als 50%, besonders bevorzugt um mehr als 80%, ganz besonders bevorzugt um mehr als 90%, am meisten bevorzugt mehr als 95% vermindert. Dabei kann die 20 Verminderung durch dem Fachmann geläufigen Verfahren ermittelt werden. So kann die Verminderung der Proteinmenge beispielsweise durch immunologischen Nachweis des Proteins bestimmt werden. Weiterhin können biochemische Techniken wie Northern-Hybridisierung, "nuclease protection assay", Reverse Transkription (quantitative RT-PCR), ELISA ("enzyme linked immunosorbent assay"), Western-Blotting, Radioimmunoassay (RIA) oder andere Immunoassays sowie "fluorescence activated cell analysis" (FACS) eingesetzt 25 werden. Je nach Art des verminderten Proteinproduktes kann auch dess Aktivität oder der Einfluss auf den Phänotyp des Organismus 30 oder der Zelle ermittelt werden.

"Proteinmenge" meinte die Menge eines bestimmten Polypeptides in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment.

40 "Verminderung" der Proteinmenge meint die mengenmässige Verminderung der Menge eines bestimmten Polypeptides in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment - beispielsweise durch das erfindungsgemäße Verfahren - im Vergleich 45 zu dem Wildtyp derselben Gattung und Art auf den dieses Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonst gleichen Rahmenbedingungen (wie beispielsweise Kulturbedingungen, Alter, Nährstoffzufuhr

etc.). Der Verminderung beträgt dabei mindestens 10 %, bevorzugt mindestens 10% oder mindestens 20%, besonders bevorzugt um mindestens 40% oder 60%, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70% oder 80%, am meisten bevorzugt um mindestens 90% oder 95%. Verfahren zur Bestimmung der Proteinmenge sind dem Fachmann bekannt. Beispielhaft seien zu nennen: Das Mikro-Biuret Verfahren (Goa J (1953) Scand J Clin Lab Invest 5:218-222), die Folin-Ciocalteu-Methode (Lowry OH et al. (1951) J Biol Chem 193:265-275) oder die Messung der Adsorption von CBB G-250 (Bradford MM (1976) Analyt Biochem 72:248-254).

"Verschieden" meint in Bezug auf zwei endogene Zielgene bevorzugt, dass die von den beiden endogenen Zielgenen transkribierte RNA oder mRNA nicht identisch ist. Bevorzugt ist die Homologie der von den beiden endogenen Zielgenen transkribierte RNA oder mRNA geringer als 90%, bevorzugt geringer als 80%, besonders bevorzugt geringer als 70%, ganz besonders bevorzugt geringer als 60%, am meisten bevorzugt geringer als 50% über jeweils die gesamte Länge der transkribierten RNA oder mRNA.

"Zumindest teilweise doppelsträngiges Ribonukleinsäuremolekül" (infolge dsRNA) meint Ribonukleinsäuremolekül, die ganz oder teilweise doppelsträngig sind. Bevorzugt ist die Ribonukleinsäuresequenz überwiegend vollständig doppelsträngig. "Überwiegend vollständig doppelsträngig" meint, dass zumindest 50%, bevorzugt 70%, besonders bevorzugt 80%, ganz besonders bevorzugt 90% der in dem Molekül vorhandenen Basen in Paarung mit einer anderen Base der dsRNA vorliegen oder - entsprechend der Sequenz der dsRNA und den Basenpaarregeln sowie gegebenenfalls einer RNA-Sekundärstrukturvoraussage mittels eines geeigneten Computeralgorithmus - zumindest theoretisch vorliegen können.

"Im wesentlichen identisch" meint, dass eine "sense"-Ribonukleotidsequenz der dsRNA auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu der Sequenz des "sense"-RNA-Transkriptes eines endogenen Zielgens aufweisen kann. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Basen einer Nukleinsäuresequenz. Bevorzugt beträgt die Homologie zwischen einer "sense"-Ribonukleotidsequenz einer dsRNA und mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkript eines endogenen Zielgens mindestens 60 %, bevorzugt mindestens 70 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 %, am meisten bevorzugt 95%. Die Sequenzen können auch identisch mit der korrespondierenden Sequenz des Zielgens sein. Eine 100%ige Sequenzidentität zwischen der "sense"-Ribonukleotidsequenz der dsRNA und mindestens einem Teil des "sense"-Stranges der Transkriptes eines endogenen Gens ist bevorzugt, wenn gleich

nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Verminderung der Expression des endogenen Gens zu bewirken. Einzelne Mutationen werden toleriert. Das Verfahren ist demnach tolerant gegenüber Sequenzabweichungen, wie sie infolge genetischer Mutationen, Polymorphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können. So ist es beispielsweise auch möglich mit einer einzigen dsRNA, die ausgehend von einer bestimmten endogenen Gen generiert wurde, die Expression weiterer homologer endogener Gene des gleichen Organismus oder aber auch die Expression homologer endogener Gene in anderen verwandten Arten zu unterdrücken.

Unter Homologie wird das Maß der Übereinstimmung zwischen zwei Nukleotid-, Ribonukleotid- oder Proteinsequenzen verstanden, die bevorzugt durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus 15 GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA; Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389ff) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

20 Gap Weight: 50 Length Weight: 3

Average Match: 10 Average Mismatch: 0

Dem Fachmann ist bewusst, dass wenn die Homologie zwischen DNA 25 (z.B. Genen) und RNA bestimmt wird, Thymin (T) in der DNA Sequenz als äquivalent zu Uracil (U) in der RNA Sequenz betrachtet wird.

30 "Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines endogenen Zielgens" meint Fragmente einer RNA oder mRNA transkribiert von einem endogenen Zielgen. Dabei hat besagtes Teil bevorzugt eine Sequenzlänge von mindestens 10 Basen, bevorzugt mindestens 25 Basen, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Basen, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen. Umfasst ist auch die vollständige 35 transkribierte RNA oder mRNA.

Alternativ, kann eine "im wesentlichen identische" dsRNA auch als Nukleinsäuresequenz definiert werden, die befähigt ist, mit einem Teil eines Transkriptes, bevorzugt der mRNA, eines endogenen 40 Zielgenes zu hybridisieren (z.B. in 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA bei 50°C oder 70°C für 12 bis 16 h oder unter anderen Standardhybridisierungsbedingungen).

45 "Standardhybridisierungsbedingungen" ist breit zu verstehen und meint weniger stringente als auch - bevorzugt - stringente Hybridisierungsbedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind unter anderem bei Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T et al., in

Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57) oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. beschrieben.

5

Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrittes ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit ungefähr 2X SSC bei 50°C) und - bevorzugt - solchen mit hoher Stringenz (mit ungefähr 0,2X SSC 10 bei 50°C bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M NaCl, pH 7.0). Darüberhinaus kann die Temperatur während des Waschschrittes von niedrig stringenten Bedingungen bei Raumtemperatur, ungefähr 22°C, bis zu - bevorzugt - stärker stringenten Bedingungen bei ungefähr 65°C angehoben werden. Beide Parameter, 15 Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50% Formamid wird 20 die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt. Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschrift sind infolge gegeben:

(1) Hybridisierungbedingungen zum Beispiel aus nachfolgenden Bedingungen ausgewählt sein:

- a) 4X SSC bei 65°C,
- b) 6X SSC bei 45°C,
- c) 6X SSC, 100 µg/ml denaturierter, fragmentierte Fischsperma-DNA bei 68°C,
- f) 50% Formamid, 4X SSC bei 42°C,
- h) 2X oder 4X SSC bei 50°C (schwach stringente Bedingung),
- i) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42°C (schwach stringente Bedingung).

35

(2) Waschschrifte können zum Beispiel aus nachfolgenden Bedingungen ausgewählt sein:

- a) 0,015 M NaCl/0,0015 M Natriumcitrat/0,1% SDS bei 50°C.
- b) 0,1X SSC bei 65°C.
- c) 0,1X SSC, 0,5% SDS bei 68°C.
- d) 0,1X SSC, 0,5% SDS, 50% Formamid bei 42°C.
- e) 0,2X SSC, 0,1% SDS bei 42°C.
- f) 2X SSC bei 65°C (schwach stringente Bedingung).

45

"Im wesentlichen komplementär" meint, dass die "antisense"-Ribonukleotidsequenzen der dsRNA auch Insertionen, Deletionen sowie

einzelne Punktmutationen im Vergleich zu dem Komplement der "sense"-Ribonukleotidsequenzen aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 80 %, bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 100% 5 zwischen den "antisense"-Ribonukleotidsequenzen und dem Komplement der "sense"-Ribonukleotidsequenzen. Komplement meint dabei - in der dem Fachmann geläufigen Weise - den entsprechend den Basenpaarregeln abgeleiteten Gegenstrang.

10 Die doppelsträngige Struktur der dsRNA kann ausgehend von einem einzigen, ganz oder teilweise selbstkomplementären RNA-Strang (bei dem die oben erwähnten "sense"- und "antisense"-Ribonukleotidsequenzen der dsRNA alle kovalent miteinander verbunden sind) oder ausgehend von zwei RNA-Strängen (indem die oben erwähnten 15 "sense"- und "antisense"-Ribonukleotidsequenzen der dsRNA auf separate Stränge vorliegen), die zueinander ganz oder teilweise komplementär sind, gebildet werden. Bei zwei separaten Strängen können beispielsweise alle "sense"-Ribonukleotidsequenzen auf dem einen und alle "antisense"-Ribonukleotidsequenzen auf dem anderen 20 Strang vorliegen. Die Sequenzen können aber auch anders auf die beiden Stränge verteilt sein. Die Ausbildung der doppelsträngigen Struktur kann *in vitro* aber auch *in vivo* - beispielsweise in der eukaryotischen Zelle selber - erfolgen. Bevorzugt liegt die dsRNA in Form eines einzigen, selbstkomplementären RNA-Stranges vor.

25 Die einzelnen "sense"-Ribonukleotidsequenzen können mit den korrespondierenden, im wesentlichen komplementären "antisense"-Ribonukleotidsequenzen eine doppelsträngige RNA-Struktur mittels Basenpaarung ausbilden und bilden eine Untereinheit der dsRNA.

30 Im Falle eines selbstkomplementären Stranges ergeben sich verschiedene Möglichkeiten für die Primärstruktur der dsRNA. Nachfolgend aufgeführte sind beispielhaft, jedoch nicht einschränkend zu verstehen:

35 a) Es können zunächst die "sense"-Ribonukleotidsequenzen (S) der einzelnen Untereinheiten aneinander gefügt werden, wodrauf dann eine Aneinanderreihung der im wesentlichen komplementären "antisense"-Ribonukleotidsequenzen (AS) folgt. Die Anzahl der Einheiten n ist größer oder gleich zwei. Es entsteht eine 40 Struktur mit einer einzelnen Haarnadel. Die Primärstruktur der dsRNA kann dabei schematisch beispielsweise wie folgt aussehen:

45 $5' - S(1) - S(2) - \dots - S(n) - AS(n) - \dots - AS(2) - AS(1) - 3'$

Die bevorzugte Sekundärstruktur ist in Fig. 2-A wiedergegeben.

5 b) Es können zunächst die "sense"-Ribonukleotidsequenz (S) und die im wesentlichen komplementäre "antisense"-Ribonukleotidsequenz (AS) der ersten Untereinheiten aneinander gefügt werden, wodurch dann die Aneinanderreihung von "sense"- und "antisense"-Ribonukleotidsequenzen der weiteren Untereinheiten folgt. Die Anzahl der Einheiten n ist größer oder gleich 10 zwei. Es entsteht eine Struktur mit mehreren Haarnadeln. Die Primärstruktur der dsRNA kann dabei schematisch beispielsweise wie folgt aussehen:

5' -S(1)-AS(1)-S(2)-AS(2).....-S(n)-AS(n)-3'

15

Die bevorzugte Sekundärstruktur ist in Fig. 2-B wiedergegeben.

Ist die dsRNA - bevorzugt - in der Lage eine Haarnadelstruktur auszubilden, so entspricht der Stamm der Haarnadel dem doppelsträngige Anteil der dsRNA, der durch Basenpaarung zwischen auf dem gleichen RNA-Moleküle lokalisierten "sense"- und "antisense"-Ribonukleotidsequenz gebildet wird. Dabei werden "sense"- und "antisense"-Ribonukleotidsequenzen bevorzugt durch einen "Linker" verbunden. Der "Linker" ist bevorzugt ein Intron, das aus der 25 dsRNA herausgespleißt werden kann. Selbstkomplementären dsRNA-Strukturen ausgehend von einem einzelnen RNA-Molekül sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression eines Kontraktes erfordern und die komplementären RNA-Stränge stets in einem äquimolaren Verhältnis umfassen.

30

Bei der Verwendung eines Linkers (I) - bevorzugt eines Intron - seien nachfolgende schematische Primärstrukturen für die dsRNA beispielhaft genannt:

35 c) Dies ist eine bevorzugte Variante von a), bei der an der Stelle der Haarnadelschlaufe ein Linker (I) - bevorzugt ein Intron - insertiert wird:

5' -S(1)-S(2)-.....-S(n)-I-AS(n)-....-AS(2)-AS(1)-3'

40

Die bevorzugte Sekundärstruktur ist in Fig. 2-C wiedergegeben.

45 d) Dies ist eine bevorzugte Variante von b), bei der an der Stelle der jeder Haarnadelschlaufe ein Linker (I) - bevorzugt ein Intron - insertiert wird:

5' -S(1)-I-AS(1)-S(2)-I-AS(2).....-S(n)-I-AS(n)-3'

5 Die bevorzugte Sekundärstruktur ist in Fig. 2-D wiedergegeben.

Die dsRNA Moleküle sind jedoch auch ohne den Linker funktionell. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die letzten ca. 10 Nukleotide der terminalen Untereinheit S(n) in diesem Fall nicht 10 mehr korrekt paaren. In diesem Fall ist die Länge für diese Untereinheit um 10 Nukleotide zu ergänzen. Der Linker ist bevorzugt ein Intron, besonders bevorzugt ein Intron in sense-Orientierung. Bevorzugt handelt es sich um ein Intron eines pflanzlichen Gens. Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien zu nennen: Das Intron 3 der Alkoholdehydrogenase 1 (Adh1) aus Mais (GenBank Acc.-No.: AF044293; GI: 2828164), das Intron 4 der beta-Conglycinin alpha Untereinheit aus Soja (GenBank Acc.-No.: AB051865); eines der Introns des rbcS-3A Gens für Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase (RBC) kleine Untereinheit aus Erbse (GenBank Acc.-No.: X04333). Diese und weitere geeignete Introns sind dem Fachmann bekannt (McCullough AJ & Schuler MA (1997) Nuc Acids Res 25:1071-1077). Für die Anwendung in dem erfindungsgemäßen Verfahren wird das Intron bevorzugt in Kombination mit Spleißakzeptor- und Spleißdonorsequenzen eingesetzt, die ein späteres Heraus- 25 spleißen aus der dsRNA ermöglichen. Diese Spleißsequenzen können die flankierenden Sequenzen des Intron selber sein, oder aber auch durch dentsprechende Sequenzen der übrigen dsRNA bereitgestellt werden.

30 Jede der einzelnen "sense"-Ribonukleotidsequenzen der dsRNA ist im wesentlichen identisch zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines endogenen Zielgens. Dabei sind jedoch nicht alle "sense"-Ribonukleotidsequenzen zu dem "sense"-RNA-Transkript eines einzigen endogenen Zielgens identisch, sondern die jeweils maximale Identität von mindestens zwei 35 der "sense"-Ribonukleotidsequenzen besteht zu den "sense"-RNA-Transkripten von unterschiedlichen endogenen Zielgenen. Dabei beträgt die Homologie zwischen den Transkripten der beiden endogenen Zielgene unter 90%, bevorzugt unter 80%, besonders bevorzugt 40 unter 70%, ganz besonders bevorzugt unter 60%, am meisten bevorzugt unter 50%.

Mindestens zwei der in der erfindungsgemäßen dsRNA umfassten einzelnen "sense"-Ribonukleotidsequenzen sind unterschiedlich. Unterschiedlich bedeutet zum einen, dass die Zielgene zu deren Transkripten sie die jeweils maximale Identität aufweisen, nicht 45 identisch sind. Bevorzugt vermindert mindestens eine Untereinheit

der dsRNA die Expression eines anderen Gens als mindestens eine andere Untereinheit. Unterschiedlich kann zum anderen auch heißen, dass die "sense"-Ribonukleotidsequenzen der Untereinheiten selber im wesentlichen nicht identisch sind und bevorzugt eine 5 Homologie zu einander unter 60%, besonders bevorzugt unter 50% ganz besonders bevorzugt unter 40% aufweisen. Die dsRNA kann in einer weiteren Ausführungsform mehrerer Kopien einer Untereinheit enthalten. Weiterhin kann die dsRNA auch mehrere verschiedene Untereinheiten enthalten, die aber gegen das gleiche endogene Ziel- 10 gens gerichtet sind und deren "sense"-Ribonukleotidsequenzen beispielsweise im wesentlichen identisch sind zu unterschiedlichen Teilen des "sense"-RNA-Transkriptes des besagten endogenen Ziel- gens.

15 Dabei kann jede der einzelnen "sense"-Ribonukleotidsequenzen auch zu dem Transkript mehrerer endogener Zielgene im wesentlichen identisch sein. Dies ist besonders dann der Fall, wenn die Ziel- gene über ähnliche Sequenzabschnitte verfügen, wie es beispielsweise bei Mitgliedern von Genfamilien (z.B. Speicherproteinen) 20 der Fall ist. Dies ist eine besonders vorteilhafte Anwendungs- form, da - bei entsprechender Wahl der Ribonukleotidsequenz einer Untereinheit - besagte Untereinheit die Expression von mehr als einem Zielgen vermindern kann.

25 Vorzugsweise wird die Sequenz der dsRNA so gewählt, dass die angestrebte dsRNA Struktur nach Ausbildung der Duplex - im Vergleich zu anderen möglichen Faltungsvarianten der Primärstruktur der dsRNA - die jeweils geringste freie Energie hat. Dies kann beispielsweise durch Vermeidung von Sequenzduplikationen etc. ge- 30 währleistet werden. Die spezifische Sekundärstruktur kann beispielsweise mit geeigneten Computerprogrammen vorausgesagt und optimiert werden (z.B. FOLDRNA; Zuker and Stiegler (1981) Nucleic Acids Res 9(1):133-48).

35 Jede Untereinheit der dsRNA hat in einer bevorzugten Ausführungs- form eine Länge von mindestens 20 Basenpaaren, bevorzugt mindestens 50 Basenpaaren, besonders bevorzugt mindestens 100 Basen- paare, ganz besonders bevorzugt mindestens 250 Basenpaare.

40 In einer weiterhin bevorzugten Ausführungsform hat jede Einheit eine Länge eine ganzzahligen Vielfachen von 21 oder 22 Basenpaaren, also beispielsweise 21, 22, 42, 43, 44, 63, 64, 65, 66, 84, 85, 86, 87, 88, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 126, 127, 128, 129, 131, 132, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 168, 169, 170, 45 171, 172, 173, 174, 175, 176, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219 oder 220 Basenpaare, bevorzugt 21, 22, 42, 44, 63, 66, 84, 88,

105, 110, 126, 132, 147, 154, 168, 176, 189, 198, 210 oder 220 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt 21, 42, 63, 84, 105, 126, 147, 168, 189 oder 210 Basenpaare, am meisten bevorzugt 180 oder 210 Basenpaare.

5

Die "sense"- und/oder "antisense"-Ribonukleotidsequenzen der einzelnen Untereinheiten können direkt oder aber durch einen "Spacer" (SP; Abstandshalter) miteinander verbunden und/oder flankiert sein. Die einzelnen "Spacer" (SP) können dabei identisch 10 oder aber auch unterschiedlich sein. Der "Spacer" genügt dabei bevorzugt den gleichen Längenanforderungen wie sie oben für die Länge der Untereinheiten selber gegeben sind. Der "Spacer" kann eine doppelsträngige Struktur ausbilden, kann aber auch - beispielsweise in Form einer Blase - in ungepaarter Formation bestehen, d.h. die Basen in Strang und Gegenstrang müssen nicht zwingerweise komplementär sein. Bevorzugte Ausführungsformen sind 15 zum Beispiel durch nachfolgende Primärstrukturen beschrieben:

e) Dies ist eine bevorzugte Variante von c):
20 5' SP-S(1)-SP-S(2)-SP-...-S(n)-AS(n)-SP-...-AS(2)-SP-AS(1)-SP-3'

Die bevorzugte Sekundärstruktur ist in Fig. 3-A wiedergegeben.

25

Der "Spacer" kann weitere Funktionselemente umfassen. Beispielsweise jedoch nicht einschränkend sind zu nennen:

i) Sequenzen kodierend für eine von einem Ribozym als Substrat 30 erkannten Erkennungssequenz (RE). Beispielsweise kann die dsRNA nachfolgende lineare Struktur vor der Faltung einnehmen:

35 5' -S(1)-(RE)-S(2)-...-S(n)-AS(n)-...-AS(2)-(RE)-AS(1)-3'

Die bevorzugte Sekundärstruktur ist in Fig. 3-B wiedergegeben. Das entsprechende Ribozym (R) kann separat exprimiert werden kann aber auch auf der dsRNA selber kodiert sein. Dabei ist die Sequenz kodierend für ein Ribozym bevorzugt so 40 angeordnet, dass sie im gefalteten dsRNA Molekül einer Sequenz gegenüber liegt, die für dieses Ribozym als Substrat fungieren kann. Beispielsweise kann die dsRNA nachfolgende lineare Struktur vor der Faltung einnehmen:

45 5' -S(1)-(R)(RE)-S(2)-...-S(n)-AS(n)-...-AS(2)-(R)(RE)-AS(1)-3'

Die bevorzugte Sekundärstruktur ist in Fig. 3-C wiedergegeben. Durch die genannten Ausführungsformen werden nach Transkription die einzelnen Untereinheiten durch Wirkung des Ribozym voneinander getrennt. Diese Trennung ist vorteilhaft, jedoch nicht zwingend erforderlich. Entsprechend nutzbare Ribozyme und Erkennungssequenzen sind dem Fachmann bekannt.

Ribozyme meint katalytische RNA-Moleküle. Ribozyme können an jede beliebige Ziel-RNA angepasst werden und spalten das Phosphodiester-Gerüst an spezifischen Positionen, wodurch die Ziel-RNA funktionell deaktiviert wird (Tanner NK (1999) FEMS Microbiol Rev 23(3):257-275). Das Ribozym wird dadurch nicht selber modifiziert, sondern ist in der Lage, weitere Ziel-RNA-Moleküle analog zu spalten, wodurch es die Eigenschaften eines Enzyms erhält. Der Einbau von Ribozymsequenzen in "antisense"-RNAs verleiht eben diesen "antisense"-RNAs diese enzymähnliche, RNA-spaltende Eigenschaft und steigert so deren Effizienz bei der Inaktivierung der Ziel-RNA. Die Herstellung und Verwendung entsprechender Ribozym- "antisense"-RNA-Moleküle ist beispielsweise beschrieben bei Haselhoff et al. (1988) Nature 334: 585-591. Auf diese Art können Ribozyme (z.B. "Hammerhead"-Ribozyme; Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591) verwendet werden, um die eines bestimmte RNA katalytisch zu spalten. Verfahren zur Expression von Ribozymen zur Verminderung bestimmter Proteine sind beschrieben in (EP 0 291 533, EP 0 321 201, EP 0 360 257). In pflanzlichen Zellen ist eine Ribozym-Expression ebenfalls beschrieben (Steinecke P et al. (1992) EMBO J 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) Mol Gen Genet. 250(3):329-338). Geeignete Zielsequenzen und Ribozyme können zum Beispiel wie bei "Steinecke P, Ribozymes, Methods in Cell Biology 50, Galbraith et al. eds, Academic Press, Inc. (1995), S.449-460" beschrieben, durch Sekundärstrukturberechnungen von Ribozym- und Ziel-RNA sowie durch deren Interaktion bestimmt werden (Bayley CC et al. (1992) Plant Mol Biol. 18(2):353-361; Lloyd AM and Davis RW et al. (1994) Mol Gen Genet. 242(6):653-657). Beispielsweise können Derivate der Tetrahymena L-19 IVS RNA konstruiert werden, die komplementäre Bereiche zu der mRNA des zu den Spacersequenzen aufweisen (siehe auch US 4,987,071 und US 5,116,742). Alternativ können solche Ribozyme auch über einen Selektionsprozess aus einer Bibliothek diverser Ribozyme identifiziert werden (Bartel D und Szostak JW (1993) Science 261:1411-1418).

45 ii) Sequenzen kodierend für Erkennungssequenzen für RNAasen
Der "Spacer" kann Erkennungssequenzen für RNAsen, bevorzugt sequenzspezifische RNAsen wie beispielsweise RNase III ent-

halten. RNase III schneidet am Motiv 5'-AGNN-3, wenn vier dieser Motive in einer Schleife vorhanden sind (Nagel R & Ares M (2000) RNA 6:1142-1156). Die RNase kann eine pflanze-
neigene RNase sein, oder - wie beispielsweise für bakte-
rielle RNase III Proteine - auch transgen exprimiert werden.
5

iii) Sequenzen kodierend für Intronspleißsignale (IS). Dabei sind die Spleißdonor und Spleißakzeptorsequenzen bevorzugt so lo-
kalisiert, dass jeweils die Untereinheit als Intron heraus-
10 gespleißt wird. Intronspleißsignale sind in Meritt et
al. (1997) Plant Journal 12:937-943 oder in Egoavil et al.
(1997) Plant Journal 12:971-980 beschrieben.

Die dsRNA bzw. ihre Vorläufermoleküle können auf verschiedene dem
15 Fachmann geläufige Weise in einen Organismus oder eine Zelle ein-
gebracht werden. "Einbringen" ist breit zu verstehen und umfasst
im Rahmen der Erfindung alle Verfahren, die dazu geeignet eine
dsRNA bzw. ihre Vorläufermoleküle, direkt oder indirekt, in einen
Organismus oder eine Zelle, Kompartiment, Gewebe, Organ oder Sa-
20 men desselben einzuführen oder dort zu generieren. Die Einbrin-
gung kann zu einer vorübergehenden (transienten) Präsenz einer
dsRNA führen oder aber auch zu einer dauerhaften (stabilen). Um-
fasst sind Verfahren der direkten Transfektion oder Transfor-
25 mation der Zelle mit der als auch die Transformation oder Trans-
fektion der Zelle mit Expressionskassetten, die befähigt sind,
die der dsRNA zugrundeliegenden Ribonukleinsäuresequenzen in der
Zelle zu exprimieren (infolge dsRNA-Expressionssystem). Die Ex-
pression der dsRNA kann transient oder - beispielsweise nach In-
30 tegration in das Genom des Organismus - permanent erfolgen. Die
Duplex-Bildung der dsRNA kann entweder außerhalb der Zelle oder
innerhalb derselben initiiert werden.

Die dsRNA wird in einer Menge eingeführt, die zumindest eine Ko-
pie pro Zelle ermöglicht. Höhere Mengen (z.B. mindestens 5, 10,
35 100, 500 oder 1000 Kopien pro Zelle) können ggf. eine effizienter
Verminderung der Expression der Zielgene bewirken. Da dsRNA eine
außerordentlich gute Mobilität innerhalb eines Organismus hat,
ist es nicht zwingend erforderlich die dsRNA in jede Zelle des
Organismus zu applizieren. Es ist ausreichend, die dsRNA in eine
40 oder wenige Zellen einzubringen oder zu exprimieren, wobei die
erfindungsgemäße Wirkung dann auch in anderen Zellen des gleichen
Organismus erzielt werden kann.

Eine dsRNA - beispielsweise zur Verwendung in einer direkten
45 Transformation oder Transfektion - kann kann in vivo oder in vi-
tro, durch enzymatische, molekularbiologische oder chemisch-syn-
thetische Verfahren synthetisiert werden. Dazu können eukaryoti-

sche, prokaryotische oder Bakteriophagen RNA Polymerasen (wie z.B. T3-, T7- oder SP6 RNA-Polymerase) verwendet werden. Entsprechende Verfahren zu in vitro Expression von RNA sind beschrieben (WO 97/32016; US 5,593,874; US 5,698,425, US 5,712,135, US 5,789,214, US 5,804,693). Eine chemisch oder enzymatisch in vitro synthetisierte dsRNA kann vor der Einführung in eine Zelle, Gewebe oder Organismus aus dem Reaktionsgemisch beispielsweise durch Extraktion, Präzipitation, Elektrophorese, Chromatographie oder Kombinationen dieser Verfahren ganz oder teilweise aufgereiht werden. Die dsRNA kann direkt in die Zelle eingeführt werden (beispielsweise durch Partikelbeschuß oder Mikroinjektion) oder aber extrazellulär (z.B. in den interstitial Raum, das Gefäßsystem, das Verdauungssystem o.ä.) appliziert werden. Auch eine Applikation beispielsweise von dsRNA exprimierenden Organismen in Form von Nahrung ist denkbar. Es ist bekannt, dass dsRNA eine gute Zellgängigkeit und ausreichende Stabilität hat. Durch die hohe Wirksamkeit der dsRNA sind auch wenige Moleküle ausreichend, um eine gute Wirkung im Sinne der Erfindung zu erzielen.

Es können ferner Modifikationen sowohl des Zucker-Phosphat-Gerüsts als auch der Nukleoside in der dsRNA vorliegen. Beispielsweise können die Phosphodiesterbindungender der RNA dahingehend modifiziert sein, dass sie zumindest ein Stickstoff oder Schwefel-Heteroatom umfassen. Basen können dahingehend modifiziert werden, dass die Aktivität beispielsweise von Adenosindeaminase eingeschränkt wird. Die dsRNA kann enzymatisch oder ganz oder teilweise chemisch-synthetisch hergestellt werden.

Bevorzugt wird die dsRNA jedoch ausgehend von entsprechenden Expressionssystemen in der Zelle exprimiert. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft besagte dsRNA-Expressionssysteme. Wird die dsRNA als ein einzelner, selbstkomplementären RNA-Strang exprimiert, so umfasst das Expressionssystem eine Expressionskassette mit einer für den selbstkomplementären RNA-Strang kodierenden DNA Sequenz in funktioneller Verknüpfung mit einem Promotor, der geeignet ist, die Expression in der jeweiligen eukaryotischen Zelle zu gewährleisten. Optional kann die Expressionskassette weitere funktionelle Elemente wie beispielsweise Transkriptionsterminatoren und/oder Polyadenylierungssignale umfassen. Derartige Expressionskassetten sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Wird die dsRNA in Form von zwei separaten Strängen exprimiert, die zueinander ganz oder teilweise komplementär sind, so umfasst das Expressionssystem zwei Expressionskassetten, wobei jeder der beiden Stränge in funktioneller Verknüpfung mit einem Promotor steht, der geeignet ist, die Expression in der jeweiligen euka-

ryotischen Zelle zu gewährleisten. Optional können die Expressionskassetten weitere funktionelle Elemente wie beispielsweise Transkriptionsterminatoren und/oder Polyadenylierungssignale umfassen. Die Kombination der beiden Expressionskassetten zu dem 5 erfindungsgemäßen Expressionssystem kann auf verschiedene dem Fachmann geläufige Art geschehen. Beispielhaft seien zu nennen:

- a) Transformation der Zelle oder Pflanze mit einem Vektor, der Expressionskassetten für beide RNA-Stränge umfasst,
- 10 b) Kotransformation der Zelle oder Pflanze mit zwei Vektoren, wobei jeweils ein Vektor für jeweils einen der beiden Stränge der dsRNA kodiert.
- 15 c) Kreuzung von zwei Pflanzen, die mit jeweils einem Vektor transformiert wurden, wobei jeweils ein Vektor für jeweils einen der beiden Stränge der dsRNA kodiert.

Es ist auch möglich, dass eine Expressionskassette einzusetzen, 20 bei der die für die dsRNA kodierende DNA-Sequenz zwischen zwei Promotoren mit entgegengerichteter Transkriptionsrichtung lokalisiert ist und so von beiden Seiten transkribiert wird.

Expressionskassette meint chimäre DNA-Moleküle in denen eine für 25 das dsRNA-Molekül (bzw. für einen der Stränge desselben) kodierende Nukleinsäuresequenz mit mindestens einem genetischen Kontrollelement (beispielsweise einem Promotor, Enhancer, Silencer, Splice-Donor oder -Akzeptor, Polyadenylierungssignal) derart verknüpft ist, dass die Transkription des dsRNA-Moleküls (bzw. eines 30 der Stränge desselben) in der eukaryotischen Zelle oder Organismus gewährleistet ist. Entsprechend vorteilhafte Konstruktionen sind weiter unten beschrieben. Eine Polyadenylierung ist möglich, jedoch nicht erforderlich, ebenso müssen keine Elemente zur Initiierung einer Translation vorhanden sein.

35 Soll das Expressionskonstrukt in eine Pflanze eingeführt und die dsRNA in plantae erzeugt werden, so sind pflanzenspezifische genetische Kontrollelemente (beispielsweise pflanzenspezifische Promotoren) bevorzugt. Die dsRNA kann jedoch auch in anderen Organismen oder in vitro erzeugt und dann in die Pflanze eingebracht werden.

Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung eines Promotors mit der zu transkribierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator und/oder Polyadenylierungssignalen derart, dass jedes der regulativen Elemente seine

Funktion bei der Transkription der Nukleinsäuresequenz, je nach Anordnung der Nukleinsäuresequenzen erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die zu transkribierende Nukleinsäuresequenz hinter der als Promoter fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die zu transkribierende Nukleinsäuresequenz so hinter dem Promotor lokalisiert, das der Transkriptionsstart identisch ist mit dem gewünschten Beginn der dsRNA.

Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung als auch die Herstellung einer Expressionskassette kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in Maniatis T, Fritsch EF und Sambrook J (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Silhavy TJ, Berman ML und Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Ausubel FM et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience und bei Gelvin et al. (1990) In: Plant Molecular Biology Manual beschrieben sind.

30

Unter einer Expressionskassette sind aber auch solche Konstruktionen zu verstehen, bei denen zum Beispiel eine Nukleinsäuresequenz kodierend für eines dsRNA derart hinter einen endogenen Promotor platziert werden, dass der gleiche Effekt auftritt. Beide Ansätze führen zu Expressionskassetten im Sinne der Erfindung.

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden, solange sie die Expression in dem Zielorganismus gewährleisten. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Es können weitere Promotoren funktionell mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sein, die eine Expression in weiteren Eukaryoten oder in Prokaryoten, wie zum Beispiel *E.coli* Bakterien ermöglichen.

5

Die in den erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Vektoren enthaltenen Nukleinsäuresequenzen können mit weiteren genetischen Kontrollsequenzen neben einem Promoter funktionell verknüpft sein. Der Begriff der genetischen Kontrollsequenzen ist breit zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluss auf das Zustandekommen oder die Funktion der erfindungsgemäßen Expressionskassette haben. Genetische Kontrollsequenzen modifizieren zum Beispiel die Transkription in prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Vorzugsweise umfassen die erfindungsgemäßen Expressionskassetten 5'-stromaufwärts von der jeweiligen transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz einen pflanzenspezifischen Promoter und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz als zusätzliche genetische Kontrollsequenz, sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils funktionell verknüpft mit der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Regionen, Introns oder nichtkodierende 3'-Region von Genen. Es ist gezeigt worden, dass diese eine signifikante Funktion bei der Regulation der Genexpression spielen können. Kontrollsequenzen umfassen ferner Polyadenylierungssignale sowie Terminatorsequenzen.

Die Expressionskassette kann vorteilhafterweise eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promoter enthalten, die eine erhöhte transgene Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminator. Die transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom erlauben. Methoden wie die cre/lox-Technologie erlauben eine gewebespezifische, unter Umständen induzierbare Entfernung der Expressionskassette aus dem Genom des Wirtsorganismus (Sauer B 45 (1998) Methods. 14(4):381-92). Hier werden bestimmte flankierende

Sequenzen dem Zielgen angefügt (lox-Sequenzen), die später eine Entfernung mittels der cre-Rekombinase ermöglichen.

Bevorzugt kann die Expressionskassette, bestehend aus einer Ver-
5 knüpfung von Promoter und zu transkribierender Nukleinsäurese-
quenz, integriert in einem Vektor vorliegen und durch zum Bei-
spiel Transformation - nach einem der unten beschriebenen Verfah-
ren - in die eukaryotische Zelle oder Organismus eingebracht wer-
den. Die nachfolgende Expression kann transient sein oder aber
10 auch - bevorzugt - stabil nach Insertion (beispielsweise unter
Verwendung von Selektionsmarkern) der Expressionskassetten in das
Genom erfolgen. Bevorzugt wird das dsRNA-Expressionssystem stabil
in das Genom - beispielsweise die chromosomale DNA oder die DNA
der Organellen (z.B. der Plastiden, Mitochondrien etc.) - einer
15 Zelle integriert.

Die Einführung einer erfindungsgemäßen transgenen Expressions-
kassette in einen Organismus oder Zellen, Geweben, Organe, Teile
bzw. Samen desselben (bevorzugt in Pflanzen bzw. pflanzliche Zel-
20 len, Gewebe, Organe, Teile oder Samen) kann vorteilhaft unter
Verwendung von Vektoren realisiert werden, in denen die transge-
nen Expressionskassetten enthalten sind. Vektoren können bei-
spielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren oder auch Agrobakte-
rien sein. Die transgenen Expressionskassetten können in den Vek-
25 tor (bevorzugt ein Plasmidvektor) über eine geeignete Restrikti-
onsschnittstelle insertiert werden. Der entstandene Vektor wird
zunächst in E.coli eingeführt. Korrekt transformierte E.coli wer-
den selektioniert, gezüchtet und der rekombinante Vektor mit dem
Fachmann geläufigen Methoden gewonnen. Restriktionsanalyse und
30 Sequenzierung können dazu dienen, den Klonierungsschritt zu über-
prüfen. Bevorzugt sind solche Vektoren, die eine stabile Integra-
tion der Expressionskassette in das Wirtsgenom ermöglichen.

Die Herstellung eines transformierten Organismus (bzw. einer
35 transformierten Zelle oder Gewebes) erfordert, dass die entspre-
chende DNA (z.B. der Expressionsvektor) oder RNA in die entspre-
chende Wirtszelle eingebracht wird. Für diesen Vorgang, der als
Transformation (oder Transduktion bzw. Transfektion) bezeichnet
wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (Keown et
40 al. (1990) Methods in Enzymology 185:527-537). So kann die DNA
oder RNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion oder durch Bom-
bardierung mit DNA-beschichteten Mikropartikeln eingeführt wer-
den. Auch kann die Zelle chemisch, zum Beispiel mit Polyethylen-
glycol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch Diffusion
45 in die Zelle gelangen kann. Die DNA kann auch durch Protopla-
stenfusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells,
Zellen, Lysosomen oder Liposomen erfolgen. Elektroporation ist

eine weitere geeignete Methode zur Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert werden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (beispielsweise bei Bilang et al. (1991) Gene 100:247-250; Scheid et al. 5 (1991) Mol Genet 228:104-112; Guerche et al. (1987) Plant Science 52:111-116; Neuhouse et al. (1987) Theor Appl Genet 75:30-36; Klein et al. (1987) Nature 327:70-73; Howell et al. 10 (1980) Science 208:1265; Horsch et al. (1985) Science 227:1229-1231; DeBlock et al. (1989) Plant Physiology 91:694-701; Methods for Plant Molecular Biology (Weissbach and Weissbach, 15 eds.) Academic Press Inc. (1988); and Methods in Plant Molecular Biology (Schuler and Zielinski, eds.) Academic Press Inc. (1989)).

15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Zellen, die eines der erfindungsgemäßen dsRNA Moleküle, Expressionssysteme, Expressionskassetten oder Expressionsvektoren enthalten. Die Zelle kann von einem Organismus abgeleitet oder in diesem enthalten sein, meint aber auch einzellige Organismen wie Mikroorganismen. Die 20 Zelle kann prokaryotisch oder eukaryotischer Natur sein. Wobei das erfindungsgemäße Verfahren auf eukaryotische Organismen angewendet wird. Dennoch können prokaryotische Organismen die erfindungsgemäßen Expressionssysteme beispielsweise zum Zwecke der dsRNA-Produktion enthalten. Auch können prokaryotische Organismen, beispielsweise Agrobakterien, vorteilhaft als Vehikel für 25 die Transformation beispielsweise pflanzlicher Organismen eingesetzt werden.

Bevorzugte Prokaryoten sind vor allem Bakterien wie Bakterien der 30 Gattung Escherichia, Corynebacterium, Bacillus, Clostridium, Proionibacterium, Butyrivibrio, Eubacterium, Lactobacillus, Erwinia, Agrobacterium, Flavobacterium, Alcaligenes, Phaeodactylum, Colpidium, Mortierella, Entomophthora, Mucor, Cryptocodium oder Cyanobakterien zum Beispiel der Gattung Synechocystis. Be- 35 vorzugt sind vor allem Mikroorganismen, welche zur Infektion von Pflanzen und damit zur Übertragung der erfindungsgemäßen Konstrukte befähigt sind. Bevorzugte Mikroorganismen sind solche aus der Gattung Agrobacterium und insbesondere der Art Agrobacterium tumefaciens.

40 Eukaryotische Zellen und Organismen umfasst pflanzliche und tierische, nicht-menschliche Organismen und/oder Zellen sowie eukaryotische Mikroorganismen wie beispielsweise Hefen, Algen oder Pilze. Eine entsprechender transgener Organismus kann beispiels- 45 weise durch Einführung der entsprechenden Expressionssysteme in

eine Zygote, Stammzelle, Protoplast oder eine andere geeignete von dem Organismus abgeleitete Zelle hergestellt werden.

"Tierische Organismus" meint nicht-menschliche Vertebraten oder

5 Invertebraten. Bevorzugte Vertebraten umfassen beispielsweise Fischarten, nicht-menschliche Säugetiere wie Rind, Pferd, Schaf, Ziege, Maus, Ratte oder Schwein, sowie Vögel wie Huhn oder Gans. Bevorzugte tierische Zellen umfassen CHO, COS, HEK293 Zellen. Invertebraten umfassen Nematoden oder andere Würmer sowie Insekten.

10 Invertebraten umfassen Insektenzellen wie Drosophila S2 und Spodoptera Sf9 oder Sf21 Zellen.

Bevorzugt sind ferner Nematoden, die in der Lage sind Tiere oder Menschen zu befallen, wie solche der Gattungen Ancylostoma, Ascaris, Bunostomum, Caenorhabditis, Capillaria, Chabertia, Cooperia, Dictyocaulus, Haemonchus, Heterakis, Nematodirus, Oesophagostomum, Ostertagia, Oxyuris, Parascaris, Strongylus, Toxascaris, Trichuris, Trichostrongylus, Tfchchonema, Toxocara oder Uncinaria. Ferner bevorzugt sind solche, die in der Lage sind 20 pflanzliche Organismen zu befallen wie beispielsweise Bursaphelenchus, Criconemella, Diiylenchus, Ditylenchus, Globodera, Heterocotylenchus, Heterodera, Longidorus, Melodoigyne, Nacobbus, Paratylenchus, Pratylenchus, Radopholus, Rotelychus, Tylenchus oder Xiphinema. Bevorzugte Insekten umfassen solche der Gattungen 25 Coleoptera, Diptera, Lepidoptera und Homoptera.

Bevorzugte Pilze sind Aspergillus, Trichoderma, Ashbya, Neurospora, Fusarium, Beauveria oder weitere in Indian Chem Engr. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze. Besonders bevorzugt ist der filamentöse Hemiascomycet Ashbya gossypii.

Bevorzugte Hefen sind Candida, Saccharomyces, Hansenula oder Pichia, besonders bevorzugt sind Saccharomyces cerevisiae oder Pichia pastoris (ATCC Accession No. 201178).

Als transgene Organismen bevorzugt sind vor allem pflanzliche Organismen. "Pflanzlicher Organismus" umfasst jeden Organismus, der zur Photosynthese befähigt ist, sowie die von diesem abgeleitete 40 Zellen, Gewebe, Teile oder Vermehrungsgut (wie Samen oder Früchte). Eingeschlossen sind im Rahmen der Erfindung alle Gattungen und Arten höherer und niedrigerer Pflanzen des Pflanzenreiches. Einjährige, mehrjährige, monocotyledone und dicotyledone Pflanzen sowie Gymnospermen sind bevorzugt. Eingeschlossen sind 45 reife Pflanze, Saatgut, Sprosse und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut (zum Beispiel Knollen, Samen oder Früchte) und Kulturen, zum Beispiel Zell- oder Kalluskulturen.

Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium.

5 "Pflanze" im Rahmen der Erfindung meint alle Gattungen und Arten höherer und niedrigerer Pflanzen des Pflanzenreiches. Eingeschlossen unter dem Begriff sind die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprossen und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut, Pflanzenorgane, Gewebe, Protoplasten, Kallus und andere

10 Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen, sowie alle anderen Arten von Gruppierungen von Pflanzenzellen zu funktionellen oder strukturellen Einheiten. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium.

15 "Pflanze" umfasst alle einjährige und mehrjährige, monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen und schließt beispielhaft jedoch nicht einschränkend solche der Gattungen Cucurbita, Rosa, Vitis, Juglans, Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manihot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersicon, Nicotiana, Solarium, Petunia, Digitalis, Majorana, Ciahorium, Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Heterocallis, Nemesis, Pelargonium, Panicum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browalia, Glycine, Pisum, Phaseolus, Lolium, Oryza, Zea, Avena, Hordeum, Secale, Triticum, Sorghum, Picea und Populus ein.

Bevorzugt sind Pflanzen nachfolgender Pflanzenfamilien: Amaranthaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Carophyllaceae, Chenopodiaceae, 30 Compositae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Labiate, Leguminosae, Papilioideae, Liliaceae, Linaceae, Malvaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Saxifragaceae, Scrophulariaceae, Solanacea, Sterculiaceae, Tetragoniacea, Theaceae, Umbelliferae.

35 Bevorzugte monokotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den monokotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel der Familie der Gramineae wie Alfalfa, Reis, Mais, Weizen oder andere Getreidearten wie Gerste, Hirse, Roggen, Triticale oder Hafer sowie dem Zuckerrohr sowie alle Arten von Gräsern.

40 Die Erfindung wird ganz besonders bevorzugt aus dikotyledone pflanzliche Organismen angewendet. Bevorzugte dikotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den dikotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel

24

- Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes oder Calendula und andere mehr,
- Compositae, besonders die Gattung Lactuca, ganz besonders die Art sativa (Salat) und andere mehr,
- Cruciferae, besonders die Gattung Brassica, ganz besonders die Arten napus (Raps), campestris (Rübe), oleracea cv Tastie (Kohl), oleracea cv Snowball Y (Blumenkohl) und oleracea cv Emperor (Broccoli) und weitere Kohlarten; und der Gattung Arabidopsis, ganz besonders die Art thaliana sowie Kresse oder Canova und andere mehr,
- Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini und andere mehr,
- Leguminosae besonders die Gattung Glycine, ganz besonders die Art max (Sojabohne) Soja sowie Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuss und andere mehr
- Rubiaceae, bevorzugt der Unterklasse Lamiidae wie beispielsweise Coffea arabica oder Coffea liberica (Kaffestrauch) und andere mehr,
- Solanaceae besonders die Gattung Lycopersicon, ganz besonders die Art esculentum (Tomate) und die Gattung Solanum, ganz besonders die Art tuberosum (Kartoffel) und melongena (Aubergine) sowie Tabak oder Paprika und andere mehr,
- Sterculiaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise Theobroma cacao (Kakastrauch) und andere mehr,
- Theaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise Camellia sinensis oder Thea sinensis (Teestrauch) und andere mehr,
- Umbelliferae, besonders die Gattung Daucus (ganz besonders die Art carota (Karotte)) und Apium (ganz besonders die Art graveolens dulce (Selarie)) und andere mehr; und die Gattung Capsicum, ganz besonders die Art annum (Pfeffer) und andere mehr,
- sowie Lein, Soya, Baumwolle, Hanf, Flachs, Gurke, Spinat, Möhre, Zuckerrübe und den verschiedenen Baum-, Nuss- und Weinarten, insbesondere Banane und Kiwi.
- Umfasst sind ferner Schmuckpflanzen, Nutz- oder Zierbäume, Blumen, Schnittblumen, Sträucher oder Rasen. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen Angiospermen, Bryophyten wie zum

Beispiel Hepaticae (Leberblümchen) und Musci (Moose); Pteridophyten wie Farne, Schachtelhalm und Lycopoden; Gymnospermen wie Koniferen, Cycaden, Ginkgo und Gnetalen, die Familien der Rosaceae wie Rose, Ericaceae wie Rhododendrons und Azaleen, Euphorbiaceae wie Weihnachtssterne und Kroton, Caryophyllaceae wie Nelken, Solanaceae wie Petunien, Gesneriaceae wie das Usambaraveilchen, Balsaminaceae wie das Springkraut, Orchidaceae wie Orchideen, Iridaceae wie Gladiolen, Iris, Freesie und Krokus, Compositae wie Ringelblume, Geraniaceae wie Geranien, Liliaceae wie der Drachenbaum, Moraceae wie Ficus, Araceae wie Philodendron und andere mehr.

Pflanzliche Organismen im Sinne der Erfindung sind weiterhin weitere photosynthetisch aktive befähigte Organismen, wie zum Beispiel Algen, Cyanobakterien sowie Moose. Bevorzugte Algen sind Grünalgen, wie beispielsweise Algen der Gattung Haematococcus, Phaeodactylum tricornatum, Volvox oder Dunaliella. Insbesondere bevorzugt ist Synechocystis.

20 Am meisten bevorzugt sind

- a) Pflanzen, die zur Ölproduktion geeignet sind, wie beispielsweise Raps, Sonnenblume, Sesam, Färberdistel (Carthamus tinctorius), Ölbaum, Soja, Mais, Erdnuß, Rizinus, Ölpalme, Weizen, Kakastrauch oder verschiedene Nussarten wie beispielsweise Walnuss, Kokosnuß oder Mandel. Unter diesen wieder besonders bevorzugt sind dikotyledonen Pflanzen, insbesondere Raps, Soja und Sonnenblume.
- 25 b) Pflanzen, die der Stärkeproduktion dienen, wie beispielsweise Mais, Weizen oder Kartoffel.
- c) Pflanzen, die als Nahrungs- und/oder Futtermittel und/oder Nutzpflanze genutzt werden und bei denen eine Resistenz gg. Pathogene vorteilhaft wäre, wie beispielsweise Gerste, Roggen, Reis, Kartoffel, Baumwolle, Flachs, Lein.
- 35 d) Pflanzen, die zur Produktion von Feinchemikalien wie beispielsweise Vitaminen und/oder Carotinoiden dienen können, wie beispielsweise Raps.

40 Die in den Verfahren verwendeten Organismen werden je nach Wirtsorganismus in dem Fachmann bekannter Weise angezogen bzw. gezüchtet. Mikroorganismen werden in der Regel in einem flüssigen Medium, das eine Kohlenstoffquelle meist in Form von Zuckern, eine Stickstoffquelle meist in Form von organischen Stickstoffquellen wie Hefeextrakt oder Salzen wie Ammoniumsulfat, Spurenelemente

wie Eisen-, Mangan-, Magnesiumsalze und gegebenenfalls Vitamine enthält, bei Temperaturen zwischen 0°C und 100°C, bevorzugt zwischen 10°C bis 60°C unter Sauerstoffbegasung angezogen. Dabei kann der pH der Nährflüssigkeit auf einen festen Wert gehalten werden, 5 das heißt während der Anzucht reguliert werden oder nicht. Die Anzucht kann batch weise, semi batch weise oder kontinuierlich erfolgen. Nährstoffe können zu Beginn der Fermentation vorgelegt oder semikontinuierlich oder kontinuierlich nach gefüttert werden.

10

Nachfolgende Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens seien beispielhaft jedoch nicht einschränkend zu nennen:

I. Pflanzenbiotechnologie

15

Bevorzugt wird das erfindungsgemäße Verfahren im Rahmen der Pflanzenbiotechnologie zur Erzeugung von Pflanzen mit vorteilhaften Eigenschaften eingesetzt. So kann Eignung der Pflanzen oder deren Samen als Nahrungs- oder Futtermittel verbessert werden, 20 beispielsweise über eine Veränderung der Zusammensetzungen und/ oder des Gehalt an Metaboliten, insbesondere Proteinen, Ölen, Vitaminen und/oder Stärke. Auch können Wachstumsrate, Ertrag oder die Resistenz gegen biotische oder abiotische Stressfaktoren erhöht werden. Nachfolgende Anwendungen im Bereich der Pflanzenbi- 25 technologie sind insbesondere vorteilhaft. Die angegebenen mögli- chen Zielgene sind beispielhaft jedoch nicht einschränkend zu verstehen:

1. Verbesserter Schutz gegen abiotische Stressfaktoren (Hitze, 30 Kälte, Trockenheit, erhöhte Feuchtigkeit, Umweltgifte, UV-Strahlung). Bevorzugt werden Gene in ihrer Expression vermindert, die an Stressreaktionen beteiligt sind.
2. Modifikation der Zusammensetzung und/oder des Gehaltes an 35 Fettsäuren, Lipiden oder Ölen

Eine Veränderung des Fettsäuregehalten oder der Fettsäurezusammensetzung, vorzugsweise in einer Ölfrucht wie Raps oder Sonnenblume, kann beispielsweise erreicht werden durch Ver- 40 minderung der Genexpression von Genen der Fettsäurebiosynthese vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ge- nen kodierend für Acetyltransacylasen, Acyltransportproteinen ("acyl carrier protein"), Desaturasen wie Stearyldesaturasen oder mikrosomale Δ12-Desaturasen insbesondere Fad2-1 Gene, 45 Malonyltransacylase, β-Ketoacyl-ACP-synthetasen, 3-Keto-ACP-reduktasen, Enoyl-ACP-hydrasen, Thioesterasen wie Acyl-ACP-thioesterases, Enoyl-ACP-reduktasen. Verschiedene weitere vor-

teilhafte Ansätze zur Modifizierung der Lipidzusammensetzung sind beschrieben (Shure M et al. (1983) Cell 35:225-233; Preiss et al. (1987) Tailoring Genes for Crop Improvement (Bruening et al., eds.), Plenum Press, S.133-152; Gupta et al. (1988) Plant Mol Biol. 10:215-224; Olive et al. (1989) Plant Mol Biol 12:525-538; Bhattacharyya et al. (1990) Cell 60:155-122; Dunwell JM (2000) J Exp Botany 51Spec No:487-96; Brar DS et al. (1996) Biotech Genet Eng Rev 13:167-79; Kishore GM und Somerville CR (1993) Curr Opin Biotech 4(2):152-8). Bevorzugt sind insbesondere Fad2 Gene (z.B. beschrieben durch Genbank Acc.-Nr.: AF124360 (*Brassica carinata*), AF042841 (*Brassica rapa*), L26296 (*Arabidopsis thaliana*), A65102 (*Corylus avellana*)). Weitere vorteilhafte Gene und Verfahren zur Modifikation des Lipidgehaltes sind beispielsweise beschrieben in US 5,530,192 und WO 94/18337. Ein erhöhter Lipidgehalt kann auch erreicht werden durch Verminderung des Stärkegehalte beispielsweise infolge verminderter Expression von Enzymen des Kohlenhydratstoffwechsels (z.B. ADP-Glucosepyrophosphorylasen).

20

3. Modifikation der Kohlenhydratzusammensetzung

Eine Modifikation der Kohlenhydratzusammensetzung kann beispielsweise erreicht werden durch Verminderung der Genexpression von Genen des Kohlenhydratstoffwechsels oder der Kohlenhydratbiosynthese, beispielsweise der Biosynthese von Amylose, Pektinen, Cellulose oder Zellwandkohlenhydraten. Dadurch kann eine Vielzahl zellulärer Prozesse (Reifung, Halbzeitigkeit, Stärkezusammensetzung oder -gehalt etc.) in vorteilhafter Weise beeinflusst werden. Als Zielgene seien beispielhaft jedoch nicht einschränkend zu nennen Phosphorylasen, Stärkesynthetasen, Q-Enzyme, Sucrose-6-phosphatsynthetasen, Sucrose-6-phosphatphosphatasen, ADP-Glucosepyrophosphorylasen, Branching-Enzyme, Debranching-Enzyme sowie diverse Amylasen. Die entsprechenden Gene sind beschrieben (Dunwell JM (2000) J Exp Botany 51Spec No:487-96; Brar DS et al. (1996) Biotech Genet Eng Rev 13:167-79; Kishore GM und Somerville CR (1993) Curr Opin Biotech 4(2):152-8). Vorteilhafte Gene zur Beeinflussung des Kohlenhydratstoffwechsels - insbesondere der Stärkebiosynthese - sind beschrieben in WO 92/11375, WO 92/11376, US 5, 365,016 und WO 95/07355.

4. Veränderung der Farbe oder Pigmentierung

45 Veränderung der Farbe oder Pigmentierung vorzugsweise von Zierpflanzen kann beispielsweise erreicht werden durch Verminderung der Genexpression von Genen der Flavonoid-Biosynt-

hese wie beispielsweise Chalconsynthasen, Chalconisomerasen, Phenylalaninammonialyasen, Dehydrokaempferol (flavone) hydroxylasen wie Flavanon-3-hydroxylasen oder Flavanon-2-hydroxylasen, Dihydroflavonolreduktasen, Dihydroflavanol-2-hydroxylasen, Flavonoid-3'-hydroxylasen, Flavonoid-5'-hydroxylasen, Flavonoidglycosyltransferasen (z.B. Glucosyltransferasen wie UDPG:Flavonoid-3-O-glucosyltransferasen, UDPG:Flavonol-7-O-glucosyltransferasen oder Rhamnosyltransferasen), Flavonoidmethyltransferasen (wie z.B. SAM:Anthocyanidin-3-(p-coumaroyl)-rutinosid-5-glucosid-3',5'-O-methyltransferasen) und Flavonoidacyltransferasen (Hahlbrock (1981) *Biochemistry of Plants*, Vol.7, Conn (Ed.); Weiring and de Vlaeminig (1984) "Petunia", KC Sink (Ed.), Springer-Verlag, New York). Geeignet sind insbesondere die in EP-A1 522 880 beschriebenen Sequenzen.

5. Verminderung des Gehaltes von Speicherproteinen

Die Verminderung der Genexpression von Genen kodierend für Speicherproteine (infolge SP) hat zahlreiche Vorteile, wie beispielsweise Verminderung des allergenen Potentials oder Veränderung in der Zusammensetzung oder Menge anderer Metabolite. Speicherproteine sind u.a. beschrieben in EP-A 0 591 530, WO 87/47731, WO 98/26064, EP-A 0 620 281; Kohno-Murase J et al. (1994) *Plant Mol Biol* 26(4): 1115-1124.

SP dienen zur Speicherung von Kohlenstoff, Stickstoff und Schwefel, die für das schnelle heterotrophe Wachstum bei Keimung von Samen oder Pollen benötigt werden. Sie haben meist keine enzymatische Aktivität. SP werden dabei nur im Embryo während der Samenentwicklung synthetisiert und akkumulieren dabei zum einen in Proteinspeichervakuolen (PSV) von unterschiedlich differenzierten Zellen im Embryo bzw. Endosperm.

"Speicherprotein" meint allgemein ein Protein, das mindestens eine der nachfolgenden wesentlichen Eigenschaften aufweist:

- i) Speicherproteine werden im wesentlichen nur im Embryo während der Samenentwicklung exprimiert. "Im wesentlichen" bedeutet dabei, dass in dem besagten Stadium mindestens 50%, bevorzugt mindestens 70%, ganz besonders bevorzugt mindestens 90%, am meisten bevorzugt mindestens 95% der Gesamtexpression über die Lebensdauer einer Pflanze hinweg stattfindet.

ii) Speicherproteine werden während der Keimung des Samen wieder abgebaut. Dabei beträgt der Abbau während der Keimung mindestens 20%, bevorzugt mindestens 50%, ganz besonders bevorzugt mindestens 80%.

5

iii) Speicherproteine machen einen wesentlichen Anteil am Gesamtproteingehalt des nicht-keimenden Samens aus. Bevorzugt macht das Speicherprotein in dem nicht-keimenden Samen der Wildtyp-Pflanze mehr als 5 Gew.% des Gesamtproteins aus, besonders bevorzugt mindestens 10 Gew.%, ganz besonders bevorzugt mindestens 20 Gew.%, am meisten bevorzugt mindestens 30 Gew.-%.

10

Bevorzugt weisen Speicherproteine 2 oder alle der oben genannten wesentlichen Eigenschaften i), ii) oder iii) auf.

15

Speicherproteine können in Untergruppen entsprechend weiterer charakteristischer Eigenschaften, wie beispielsweise ihrem Sedimentationskoeffizienten oder der Löslichkeit in verschiedenen Lösungen (Wasser, Salzlösung, Alkohol) aufgeteilt werden. Die Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten kann in der dem Fachmann vertrauten Weise mittels Ultrazentrifugation durchgeführt werden (z.B. beschrieben bei Correia JJ (2000) Methods in Enzymology 321:81-100).

20

Insgesamt können vier grosse Genfamilien für Speicherproteine aufgrund ihrer Sequenzen zugeordnet werden: 2S-Albumine (Napin-ähnlich), 7S-Globuline (Phaseolin-ähnlich), 11S/12S-Globuline (Legumin-/Cruciferin-ähnlich) und die Zein-Prolamine.

25

2S Albumine sind weit verbreitet in Samen von Dikotyledonen, einschliesslich wichtiger kommerzieller Pflanzenfamilien wie Fabaceae (z.B. Sojabohne), Brassicaceae (z.B. Raps), Euphorbiaceae (z.B. Rizinus) oder Asteraceae (z.B. Sonnenblume). 2S Albumine sind kompakte globuläre Proteine mit konservierten Cysteinresten, die oft Heterodimere bilden.

30

7S-Globuline liegen in trimerer Form vor und enthalten keine Cysteinreste. Nach ihrer Synthese werden sie wie die 2S-Albumine in kleinere Fragmente gespalten und glykosyliert. Trotz Unterschiede in der Polypeptidgrösse sind die verschiedenen 7S-Globuline hoch konserviert und gehen vermutlich wie die 2S-Albumine auf einen gemeinsamen Vorläuferprotein zurück. Die 7S-Globuline sind nur in geringen Mengen in Monokotyledonen vorhanden. In Dikotyledonen ist ihr Anteil immer kleiner verglichen mit den 11S/12S-Globulinen.

35

40

45

30

11S/12S-Globuline stellen neben den 2S-Albuminen die Hauptfraktion der Speicherproteine in Dikotyledonen. Die hohe Ähnlichkeit der verschiedenen 11S-Globuline aus verschiedenen Pflanzengattungen lassen wiederum auf einen gemeinsamen Vorläuferprotein in der Evolution schliessen.

5 Bevorzugt ist das Speicherprotein ausgewählt aus den Klassen der 2S-Albumine (Napin-ähnlich), 7S-Globuline (Phaseolin-ähnlich), 11S/12S-Globuline (Legumin-/Cruciferin-ähnlich) oder 10 Zein-Prolamine.

Besonders bevorzugte 2S-Albumine umfassen

- 15 i) 2S-Albumine aus *Arabidopsis*, ganz besonders bevorzugt die 2S-Albumine mit der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 8, am meisten bevorzugt die durch die Nukleinsäuren gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 7 kodierten Proteine,
- 20 ii) 2S-Albumine aus Arten der Gattung *Brassica*, wie beispielsweise *Brassica napus*, *Brassica nigra*, *Brassica juncea*, *Brassica oleracea* oder *Sinapis alba*, ganz besonders bevorzugt die 2S-Albumine mit der SEQ ID NO: 32, 34, 36, 38, 40, 46 oder 48, am meisten bevorzugt die durch die Nukleinsäuren gemäß SEQ ID NO: 31, 33, 35, 37, 39, 45 25 oder 47 kodierten Proteine,
- 30 iii) 2S-Albumine aus *Soja*, ganz besonders bevorzugt die 2S-Albumine mit der SEQ ID NO: 42 oder 44, am meisten bevorzugt die durch die Nukleinsäuren gemäß SEQ ID NO: 41 oder 43 kodierten Proteine,
- 35 iv) 2S-Albumine aus Sonnenblume (*Helianthus annus*), ganz besonders bevorzugt die 2S-Albumine mit der SEQ ID NO: 50 oder 52, am meisten bevorzugt die durch die Nukleinsäuren gemäß SEQ ID NO: 49 oder 51 kodierten Proteine,

40 sowie die entsprechenden Homologen und funktionellen Äquivalente zu i) oder ii) oder iii) oder iv) aus identischen oder anderen Pflanzenarten, insbesondere Raps, Sonnenblume, Lein, Sesam, Färberdistel, Ölbaum, Soja oder verschiedene Nussarten. Funktionelle Äquivalente zeichnen sich bevorzugt neben den oben genannten wesentlichen Eigenschaften durch charakteristische Eigenschaften wie einen 2S-Sedimentationskoeffizienten und/oder durch eine Löslichkeit in Wasser aus.

31

Funktionelle Äquivalente der 2S-Albumine haben in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform eine Homologie von mindestens 60%, bevorzugt mindestens 80%, ganz besonders bevorzugt mindestens 90%, am meisten bevorzugt mindestens 95% zu einer der Proteinsequenzen mit der SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50 oder 52 wobei die Homologie sich bevorzugt über eine Länge von mindestens 30 Aminosäuren, bevorzugt mindestens 50 Aminosäuren besonders bevorzugt über 100 Aminosäuren, am meisten bevorzugt über die gesamte Länge der jeweiligen Proteine erstreckt, und weisen die gleichen wesentlichen Eigenschaften eines Speicherproteins und - bevorzugt- die charakteristischen Eigenschaften eines 2S-Speicherproteins auf.

15 Besonders bevorzugte 7S-Globuline umfassen solche aus Arabidopsis oder Soja, ganz besonders bevorzugt die Proteine mit der SEQ ID NO: 94 oder 96, am meisten bevorzugt die durch die Nukleinsäuren gemäß SEQ ID NO: 93 oder 95 kodierten Proteine. Funktionelle Äquivalente zeichnen sich bevorzugt neben den oben genannten wesentlichen Eigenschaften durch charakteristische Eigenschaften wie einen 7S-Sedimentationskoeffizienten und/oder durch eine Löslichkeit in Salzlösung aus. Als weitere charakteristische Eigenschaft können 7S-Globuline keine Cysteinreste enthalten.

20 25 Funktionelle Äquivalente der 7S-Globuline haben in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform eine Homologie von mindestens 60%, bevorzugt mindestens 80%, ganz besonders bevorzugt mindestens 90%, am meisten bevorzugt mindestens 95% zu einer der Proteinsequenzen mit der SEQ ID NO: 94 oder 96 wobei die Homologie sich bevorzugt über eine Länge von mindestens 30 Aminosäuren, bevorzugt mindestens 50 Aminosäuren besonders bevorzugt über 100 Aminosäuren, am meisten bevorzugt über die gesamte Länge der jeweiligen Proteine erstreckt, und weisen die gleichen wesentlichen Eigenschaften eines Speicherproteins und - bevorzugt- die charakteristischen Eigenschaften eines 7S-Speicherproteins auf.

30 35 40 Besonders bevorzugte 11S/12S-Globuline umfassen bevorzugt 11S-Globuline aus Raps, Soja und Arabidopsis insbesondere

i) 11S-Globuline aus Raps mit der SEQ ID NO: 10, 12, 14, 16 oder 18, am meisten bevorzugt die durch die Nukleinsäuren gemäß SEQ ID NO: 9, 11, 13, 15 oder 17 kodierten Proteine,

ii) die 11S-Globuline aus Soja mit der SEQ ID NO: 20, 22, 24, 26 oder 28, am meisten bevorzugt die durch die Nukleinsäuren gemäß SEQ ID NO: 19, 21, 23, 25 oder 27 kodierten Proteine,

5

iii) die 11S-Globuline aus *Arabidopsis thaliana* mit der SEQ ID NO: 60, 62, 64, 66, 68 oder 70 am meisten bevorzugt die durch die Nukleinsäuren gemäß SEQ ID NO: 59, 61, 63, 65, 67 oder 69 kodierten Proteine,

10

sowie die entsprechenden Homologen und funktionellen Äquivalente aus anderen Pflanzenarten, insbesondere Raps, Sonnenblume, Lein, Sesam, Färberdistel, Ölbaum, Soja oder verschiedene Nussarten, wie beispielsweise das Sonnenblume 11S Speicherprotein (SEQ ID NO: 30), insbesondere das durch die Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 29 kodierte Protein. Funktionelle Äquivalente zeichnen sich bevorzugt neben den oben genannten wesentlichen Eigenschaften durch charakteristische Eigenschaften wie einen 11S- oder 12S-Sedimentationskoeffizienten und/oder durch eine Löslichkeit in Salzlösung (PBS; phosphatgepufferte Salzlösung) und/oder eine schlechte Löslichkeit in Wasser aus.

25

Funktionelle Äquivalente der 11S- oder 12S Albumine haben in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform eine Homologie von mindestens 60%, bevorzugt mindestens 80%, ganz besonders bevorzugt mindestens 90%, am meisten bevorzugt mindestens 95% zu einer der Proteinsequenzen mit der SEQ ID NO: 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 60, 62, 64, 66, 68 oder 70

30

wobei die Homologie sich bevorzugt über eine Länge von mindestens 30 Aminosäuren, bevorzugt mindestens 50 Aminosäuren besonders bevorzugt über 100 Aminosäuren, am meisten bevorzugt über die gesamte Länge der jeweiligen Proteine erstreckt, und weisen die gleichen wesentlichen Eigenschaften eines Speicherproteins und - bevorzugt- die charakteristischen Eigenschaften eines 11S- oder 12S-Speicherproteins auf.

40

Besonders bevorzugte Zein-Prolamine umfassen bevorzugt solche aus monokotyledonen Pflanzen, insbesondere Mais, Rais, Hafer, Gerste oder Weizen. Ganz besonders bevorzugt sind die Mais Zein-Prolamine beschrieben durch SEQ ID NO: 98, 100, 102 oder 104 - insbesondere die durch SEQ ID NO 97, 99, 101 oder 103 kodierten Protein -, das Reis Prolamin gemäß SEQ ID NO: 106 - insbesondere das durch SEQ ID NO 105 kodierte Protein -, das Hafer Prolamin gemäß SEQ ID NO: 108 - insbesondere das durch SEQ ID NO 107 kodierte Proteine-, das Gerste Prolamin gemäß SEQ ID NO: 110 und/oder 111 - insbesondere das durch SEQ ID

45

NO 109 kodierte Protein - und das das Weizen Prolamin gemäß SEQ ID NO: 113 - insbesondere das durch SEQ ID NO 112 kodierte Protein. Funktionelle Äquivalente zeichnen sich bevorzugt durch eine Löslichkeit in 70%iger ethanolischer Lösung und eine schlechte Löslichkeit in Wasser oder Salzlösung aus.

Funktionelle Äquivalente der Zein-Prolamine haben in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform eine Homologie von mindestens 60%, bevorzugt mindestens 80%, ganz besonders bevorzugt mindestens 90%, am meisten bevorzugt mindestens 95% zu einer der Proteinsequenzen mit der SEQ ID NO: 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 111 oder 113 wobei die Homologie sich bevorzugt über eine Länge von mindestens 30 Aminosäuren, bevorzugt mindestens 50 Aminosäuren besonders bevorzugt über 100 Aminosäuren, am meisten bevorzugt über die gesamte Länge der jeweiligen Proteine erstreckt, und weisen die gleichen wesentlichen Eigenschaften eines Speicherproteins und - bevorzugt- die charakteristischen Eigenschaften eines Zein-Prolamine auf.

Funktionelle Äquivalente meint insbesondere natürliche oder künstliche Mutationen der obengenannten Speicherproteine sowie homologe Polypeptide aus anderen Pflanzen, die die gleichen wesentlichen und - bevorzugt - charakteristischen Eigenschaften aufweisen. Bevorzugt sind homologe Polypeptide aus oben beschriebenen bevorzugten Pflanzen. Die zu den im Rahmen dieser Erfindung offenbarten Speicherproteinen homologen Sequenzen aus anderen Pflanzen - beispielsweise solchen deren genomische Sequenz ganz oder teilweise bekannt ist, wie beispielsweise aus *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Nicotiana tabacum* oder *Solanum tuberosum* - durch Homologievergleiche aus Datenbanken auffinden können z.B. durch Datenbanksuche oder Durchmustern von Gen-Banken - unter Verwendung der beispielhaft aufgeführten Speicherprotein-Sequenzen als Suchsequenz bzw. Sonde - leicht aufgefunden werden.

Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Aminosäurereste.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung umfasst ein zumindest teilweise doppelsträngiges Ribonukleinsäuremolekül, wobei das doppelsträngige Ribonukleinsäuremolekül umfasst

i) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens zwei Ribonukleotidsequenzabschnitte, wobei jeweils mindestens einer dieser Ribonukleotidsequenzabschnitte im wesentlichen

34

identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes einer Speicherprotein-Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 oder 112 oder eines funktionellen Äquivalents derselben, wobei jedoch nicht alle Ribonukleotidsequenzabschnitte zu dem "sense"-RNA-Transkript eines einzigen einer Speicherprotein-Nukleinsäuresequenz identisch sind, und

ii) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter i) im wesentlichen komplementären ist.

15 Bevorzugt haben zumindest zwei der Speicherprotein-Nukleinsäuresequenzen, zu deren "sense"-RNA-Transkript die besagten Ribonukleotidsequenzabschnitte im wesentlichen identisch sind, untereinander eine Homologie von unter 90%, bevorzugt unter 80%, ganz besonders bevorzugt unter 60% am meisten bevorzugt unter 50% über die gesamte Länge ihrer kodierenden Nukleotidsequenz.

25 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die dsRNA mehrere Sequenzabschnitte, die eine gleichzeitige Suppression mehrerer Speicherproteine, bevorzugt von Speicherproteinen aus verschiedenen Klassen - wie beispielsweise einem 2S-Albumin, 7S-Globuline, 11S/12S-Globulin oder die Zein-Prolamine - bewirken.

30 Am meisten bevorzugt sind doppelsträngige RNA Moleküle beschrieben durch die Ribonukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 84, 86 oder 88. Diese werden bevorzugt kodiert durch Nukleotidsequenzen entsprechend SEQ ID NO: 83, 85 oder 87.

35 5. Erreichen einer Resistenz gegen pflanzliche Pathogene

40 Eine Resistenz gegen pflanzliche Pathogene wie Arachniden, Pilze, Insekten, Nematoden, Protozoen, Viren, Bakterien und Krankheiten kann erreicht werden durch Verminderung der Genexpression von Genen, die für das Wachstum, Überleben, bestimmte Entwicklungsstufen (beispielsweise Verpuppung) oder die Vermehrung einer bestimmten Pathogens essentiell sind. Eine entsprechende Verminderung kann eine vollständige Inhibition vorgenannter Schritte aber auch eine Verzögerung derselben bewirken. Dies können pflanzliche Gene sein, die dem Pathogen beispielsweise das Eindringen ermöglichen, können aber auch pathogen-eigene Gene sein. Bevorzugt ist die dsRNA

gg. Gene des Pathogens gerichtet. Als anti-Pathogenes Agens kann dabei die dsRNA selber, jedoch auch die Expressionssysteme, Expressionskassetten oder transgenen Organismen wirken. Pflanzen können beispielsweise mit geeigneten Formulierungen vorgenannter Agentien behandelt, beispielsweise besprüht oder estäubt werden. Die Pflanzen selber können jedoch in Form eines transgenen Organismus die Agentien beinhalten und diese - beispielsweise in Form eines Fraßgiftes - an die Pathogene weitergeben. Verschiedene essentielle Gene diverser Pathogene sind dem Fachmann bekannt (z.B. für Nematodenresistenz WO 93/10251, WO 94/17194).

Am meisten bevorzugt als Pathogen sind Pilzpathogene wie Phytophthora infestans, Fusarium nivale, Fusarium graminearum, Fusarium culmorum, Fusarium oxysporum, Blumeria graminis, Magnaporthe grisea, Sclerotinia sclerotium, Septoria nodorum, Septoria tritici, Alternaria brassicae, Phoma lingam, bakterielle Pathogene wie Corynebacterium sepedonicum, Erwinia carotovora, Erwinia amylovora, Streptomyces scabies, Pseudomonas syringae pv. tabaci, Pseudomonas syringae pv. phaseolicola, Pseudomonas syringae pv. tomato, Xanthomonas campestris pv. malvacearum und Xanthomonas campestris pv. oryzae, und Nematoden wie Globodera rostochiensis, G. pallida, Heterodera schachtii, Heterodera avenae, Ditylenchus dipsaci, Anguina tritici und Meloidogyne hapla.

Eine Virusresistenz kann beispielsweise durch Verminderung der Expression eines viralen Hüllproteins, einer viralen Replikase, einer viralen Protease etc. erreicht werden. Zahlreiche Pflanzenviren und entsprechende Zielgene sind dem Fachmann bekannt.

6. Verhinderung von Halmbruch

Eine verminderte Anfälligkeit gegen Halmbruch kann beispielsweise erreicht werden durch Verminderung der Genexpression von Genen des Kohlenhydratstoffwechsels (s.o.). Vorteilhafte Gene sind beschrieben (u.a. WO 97/13865) und umfassen gewebespezifische Polygalacturonasen oder Cellulasen.

40 7. Verzögerung der Fruchtreifung

Eine verzögerte Fruchtreifung kann beispielsweise erreicht werden durch Verminderung der Genexpression von Genen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Polygalacturonasen, Pectinesterasen, β -(1-4)glucanases (Cellulasen), β -Galactanases (β -Galactosidasen), oder Gene der Ethylenbiosynthese wie

36

1-Aminocyclopropan-1-carboxylatsynthase, Gene der Carotinoid-biosynthese wie z.B. Gene der Prephytoen- oder Phytoenbiosynthese beispielsweise Phytoendesaturasen. Weitere vorteilhafte Gene sind beispielsweise in WO 91/16440, WO 91/05865, WO 5 91/16426, WO 92/17596, WO 93/07275 oder WO 92/04456.

8. Erzielen einer männlichen Sterilität ("male sterility"). Entsprechende Zielgene sind beschrieben u.a. in WO 94/29465, WO 89/10396, WO 92/18625.

10 9. Verminderung unerwünschter oder toxischer Pflanzeninhaltsstoffe wie z.B. Glucosinolaten. Entsprechende Zielgene sind beschrieben (u.a. in WO 97/16559).

15 10. Verzögerung von Alterserscheinungen. Entsprechende Zielgene sind u.a. Cinnamoyl-CoA:NADPH-Reduktasen oder Cinnamoylalkoholdehydrogenasen. Weitere Zielgene sind beschrieben (u.a. in WO 95/07993).

20 11. Modifikation der Lignifikation und/oder des Ligningehaltes vor allem in Baumarten. Entsprechende Zielgene sind beschrieben u.a. in WO 93/05159, WO 93/05160.

25 12. Modifikation des Faseranteils in Nahrungsmitteln vorzugsweise in Samen durch Verminderung der Expression der Coffeinsäure-0-methyltransferase oder der Cinnamoylalkoholdehydrogenase.

13. Modifikation der Faserqualität in Baumwolle. Entsprechende Zielgene sind beschrieben u.a. in US 5,597,718.

30 14. Verminderung der Stoßanfälligkeit von beispielsweise Kartoffeln durch Verminderung beispielsweise der Polyphenoloxidase (WO 94/03607) etc.

35 15. Steigerung der Vitamin E Biosynthese beispielsweise durch Verminderung der Expression von Genen aus dem Homogentisatabauweg wie z.B. der Homogentisat-1,2-dioxygenase (HGD; EC-Nr.: 1.13.11.5), der Maleylacetoacetatisomerase (MAAI; EC-Nr.: 5.2.1.2.) oder der Fumarylacetoacetathiolase (FAAH; EC-Nr.: 3.7.1.2).

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung umfasst ein zumindest teilweise doppelsträngiges Ribonukleinsäuremolekül, wobei das doppelsträngige Ribonukleinsäuremolekül umfasst

5 i) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens zwei Ribonukleotidsequenzabschnitte, wobei jeweils mindestens einer dieser Ribonukleotidsequenzabschnitte im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines Gens aus dem Homogentisatabbauweg gemäß SEQ ID NO: 115, 116, 118 oder 120 oder eines funktionalen Äquivalentes derselben, wobei jedoch nicht alle Ribonukleotidsequenzabschnitte zu dem "sense"-RNA-Transkript eines einzigen einer Speicherprotein-Nukleinsäuresequenz identisch sind, und

10 ii) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter i) im wesentlichen komplementären ist.

15 16. Verminderung des Nikotingehaltes beispielsweise in Tabak durch verminderte Expression beispielsweise der N-Methylputrescinoxidase und der Putrescin-N-methyltransferase.

17. Verminderung des Coffeingehaltes in der Kaffeebohne (*Coffea arabica*) durch durch Verminderung der Genexpression von Genen der Coffeinbiosynthese wie 7-Methylxanthine-3-methyltransferase.

20 25 18. Verminderung des Theophyllin-Gehaltes im Tee (*Camellia sinensis*) durch durch Verminderung der Genexpression von Genen der Theophyllin-Biosynthese wie beispielsweise 1-Methylxanthin-3-methyltransferase.

30 19. Erhöhung des Methioningehaltes durch Verminderung der Threoninbiosynthese, beispielsweise durch Verminderung der Expression der Threoninsynthase (Zeh M et al .(2001) Plant Physiol 127(3):792-802).

35 Weitere Beispiele für vorteilhafte Gene sind zum Beispiel genannt bei Dunwell JM, Transgenic approaches to crop improvement, J Exp Bot. 2000;51 Spec No; Seite 487-96.

40 45 Jede der oben genannten Anwendungen kann als solche isoliert angewendet werden. Natürlich können auch mehr als eine der oben genannten Ansätze gleichzeitig angewendet werden. Dabei wird bei allen Anwendungen die Expression von mindestens zwei unterschiedlichen Zielgenen, wie oben definiert, vermindert. Diese Zielgene können dabei aus einer einzigen für eine Anwendung bevorzugten Gruppe von Genen stammen oder aber auch unterschiedlichen Anwendungsgruppen zugeordnet sein.

Zur Anwendung der erfindungsgemäßen Verfahren stehen dem Fachmann geläufige Werkzeuge, wie Expressionsvektoren mit für Pflanzen geeigneten Promotoren, sowie Verfahren zur Transformation und Regeneration von Pflanzen zur Verfügung. Pflanzenspezifische

5 Promotoren meint grundsätzlich jeden Promotor, der die Expression von Genen, insbesondere Fremdgenen, in Pflanzen oder Pflanzenteilen, -zellen, -geweben, -kulturen steuern kann. Dabei kann die Expression beispielsweise konstitutiv, induzierbar oder entwicklungsabhängig sein. Bevorzugt sind:

10

a) Konstitutive Promotoren

15 "Konstitutive" Promotoren meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten (Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der

20 Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221- 228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der "Rubisco small subunit (SSU)" -Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), den Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), den Smas Promotor, den Cinnamylal-koholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der

30 vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist.

40 b) Gewebespezifische Promotoren

Bevorzugt sind ferner Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Blüten, Blätter, Stengel, Wurzeln und Samen.

45 Samenspezifische Promotoren wie zum Beispiel der Promotor des Phaseolins (US 5,504,200; Bustos MM et al. (1989) Plant Cell 1(9):839-53), des 2S Albumingens (Joseffson LG et al. (1987) J

Biol Chem 262:12196-12201), des Legumins (Shirsat A et al. (1989) Mol Gen Genet 215(2): 326-331), des USP (unknown seed protein; Bäumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225(3):459-67), des Napin Gens (US 5,608,152; Stalberg K et al. (1996) L Planta 199:515-519), des Saccharosebindeproteins (WO 00/26388) oder der Legumin B4-Promotor (LeB4; Bäumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225: 121-128; Baeumlein et al. (1992) Plant Journal 2(2):233-9; Fiedler U et al. (1995) Biotechnology (NY) 13(10):1090f), der Oleosin-Promoter aus Arabidopsis (WO 98/45461), der Bce4-Promoter aus Brassica (WO 91/13980). Weitere geeignete samenspezifische Promotoren sind die der Gene kodierend für das "High Molecular Weight Glutenin" (HMWG), Gliadin, Verzweigungsenzym, ADP Glucose Pyrophosphatase (AG-Pase) oder die Stärkesynthase. Bevorzugt sind ferner Promotoren, die eine samenspezifische Expression in Monokotyledonen wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis etc. erlauben. Vorteilhaft eingesetzt werden können der Promoter des lpt2 oder lpt1-Gen (WO 95/15389, WO 95/23230) oder die Promotoren beschrieben in WO 99/16890 (Promotoren des Hordein-Gens, des Glutelin-Gens, des Oryzin-Gens, des Prolamin-Gens, des Gliadin-Gens, des Glutelin-Gens, des Zein-Gens, des Kasirin-Gens oder des Secalin-Gens). Weitere samenspezifische Promotoren sind beschrieben in WO89/03887.

Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren wie beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33), der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.

Blattspezifische Promotoren wie Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EMBO J 8:2445-2451).

Blütenspezifische Promotoren wie beispielsweise der Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635) oder der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593).

- Antheren-spezifische Promotoren wie den 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), den glob-1 Promotor und den γ -Zein Promotor.

c) Chemisch induzierbare Promotoren

Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die

Expression des exogenen Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 5 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden.

d) Stress- oder Pathogen-induzierbare Promotoren

Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), der licht-induzierbare PPDK Promotor oder der verwundungsinduzierte pinII-Promoter (EP375091).

Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, β -1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknas, et al. (1992) The Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Viral 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968(1989).

Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des pinII Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) The Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.

e) Entwicklungsabhängige Promotoren

Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise fruchtreifungspezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifungspezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die Gewebe spezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

Besonders bevorzugt sind konstitutive sowie samenspezifische Promotoren.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, die die expressionsteuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebe spezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasserstress, Abscisinsäure (Lam E und Chua NH, J Biol Chem 1991; 266(26): 17131 -17135) und Hitzestress (Schoffl F et al., Molecular & General Genetics 217(2-3):246-53, 1989) beschrieben.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Regionen, Introns oder nichtkodierende 3'-Region von Genen wie beispielsweise das Actin-1 Intron, oder die Adh1-S Introns 1, 2 und 6 (allgemein: The Maize Handbook, Chapter 116, Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994)). Es ist gezeigt worden, dass diese eine signifikante Funktionen bei der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente Expression heterologer Gene verstärken können. Beispielhaft für Translationsverstärker sei die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus zu nennen (Gallie et al. (1987) Nucl Acids Res 15:8693-8711) und dergleichen. Sie können ferner die Gewebsspezifität fördern (Rouster J et al. (1998) Plant. J 15:435-440).

Als Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACHS entsprechen (Gielen et al. (1984) EMBO J 3:835 ff) oder funktionelle Äquivalente davon. Beispiele für besonders geeignete Terminatorsequenzen sind der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der NOS (Nopaline-Synthase)-Terminator.

Eine Expressionskassetten und die von ihr abgeleiteten Vektoren können weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff Funktionselement ist breit zu verstehen und meint all solche Elemente,

42

die einen Einfluss auf Herstellung, Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemässen Expressionskassetten, Vektoren oder transgenen Organismen haben. Beispielsweise aber nicht einschränkend seien zu nennen:

5

- a) Selektionsmarker, die eine Resistenz gegen einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456), Antibiotika oder Biozide, bevorzugt Herbizide, wie zum Beispiel Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin, oder Phosphinothricinacetyltransferasen (PAT) kodieren und Glutaminsynthaseinhibitoren inaktivieren (bar und pat Gen), 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasegene (EPSP Synthasegene), die eine Resistenz gegen Glyphosat®. (N-(phosphonomethyl)glycin) verleihen, das für das Glyphosat® degradierende Enzyme kodierende gox Gen (Glyphosatoxidoreduktase), das deh Gen (kodierend für eine Dehalogenase, die Dalapon inaktiviert), Sulfonylurea- und Imidazolinon inaktivierende Acetolactatsynthasen sowie bxn Gene, die für Bromoxynil degradierende Nitrilaseenzyme kodieren, das aasa-Gen, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Apectinomycin verleiht, das Streptomycinphosphotransferase (SPT) Gen, das eine Resistenz gegen Streptomycin gewährt, das Neomycinphosphotransferas (NPTII) Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin oder Geneticidin verleiht, das Hygromycinphosphotransferase (HPT) Gen, das eine Resistenz gegen Hygromycin vermittelt, das Acetolactatsynthas Gen (ALS), das eine Resistenz gegen Sulfonylharnstoff-Herbizide verleiht (z.B. mutierte ALS-Varianten mit z.B. der S4 und/oder Hra Mutation).
- b) Reportergene, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren und über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressionsortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Sheen et al. (1995) Plant Journal 8(5):777-784), die Chloramphenicoltransferase, eine Luziferase (Ow et al. (1986) Science 234:856-859), das Aequorin-Gen (Prasher et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun 126(3):1259-1268), die β -Galactosidase, ganz besonders bevorzugt ist die β -Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907).

c) Replikationsursprünge, die eine Vermehrung der erfindungsge-
mässen Expressionskassetten oder Vektoren in zum Beispiel
E.coli gewährleisten. Beispielhaft seien genannt ORI (origin
of DNA replication), der pBR322 ori oder der P15A ori (Sam-
5 brook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY,
1989).

10 d) Elemente, die für eine Agrobakterium vermittelte Pflanzen-
transformation erforderlich sind, wie zum Beispiel die rechte
oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.

15 Zur Selektion erfolgreich homolog rekombinierter oder auch trans-
formierter Zellen ist es in der Regel erforderlich, einen selek-
tionierbaren Marker zusätzlich einzuführen, der den erfolgreich
rekombinierten Zellen eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Bei-
spiel ein Herbizid), einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglu-
cose-6-phosphat (WO 98/45456) oder ein Antibiotikum verleiht. Der
Selektionsmarker erlaubt die Selektion der transformierten Zellen
20 von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports
5:81-84).

25 Verschiedene Methoden und Vektoren zum Einschleusen von Genen in
das Genom von Pflanzen sowie zur Regeneration von Pflanzen aus
Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen sind bekannt (Plant Molecular
Biology and Biotechnology (CRC Press, Boca Raton, Florida), Kapi-
tel 6/7, S. 71-119 (1993); White FF (1993) Vectors for Gene
Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Enginee-
ring and Utilization, Hrsgb.: Kung und Wu R, Academic Press,
30 15-38; Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer, in:
Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.:
Kung und R. Wu, Academic Press, S.128-143; Potrykus (1991) Annu
Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 42:205-225; Halford NG, Shewry
PR (2000) Br Med Bull 56(1):62-73). Dazu zählen beispielhaft die
35 oben erwähnten. Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Me-
thoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus
Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen
Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind vor allem die
Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte
40 DNA-Aufnahme, die Liposomen vermittelte Transformation (wie z.B.
in US 4,536,475 beschrieben), biolistische Verfahren mit der Gen-
kanone ("particle bombardment" Methode; Fromm ME et al. (1990)
Bio/Technology. 8(9):833-9; Gordon-Kamm et al. (1990) The Plant
Cell 2:603), die Elektroporation, die Inkubation trockener Em-
45 bryonen in DNA-haltiger Lösung und die Mikroinjektion. Im Falle
dieser "direkten" Transformationsmethoden sind keine besonderen
Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache Plas-

mide wie die der pUC-Reihe, pBR322, M13mp Reihe, pACYC184 etc. können verwendet werden. Sollen vollständige Pflanzen aus den transformierten Zellen regeneriert werden, so ist es erforderlich, dass sich auf dem Plasmid ein zusätzliches selektionierbares 5 Markergen befindet.

Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Transformation auch durch bakterielle Infektion mittels Agrobacterium (z.B. EP 0 116 718), virale Infektion mittels viraler Vektoren 10 (EP 0 067 553; US 4,407,956; WO 95/34668; WO 93/03161) oder mittels Pollen (EP 0 270 356; WO 85/01856; US 4,684,611) durchgeführt werden.

Die für die Agrobacterium-Transformation meist verwendeten 15 Stämme Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes eine auch durch bakterielle Infektion mittels enthalten ein Plasmid (Ti bzw. Ri Plasmid), das auf die Pflanze nach Agrobacterium-Infektion übertragen wird. Ein Teil dieses Plasmids, genannt T-DNA (transferred DNA), wird in das Genom der Pflanzenzelle integriert. Alternativ können durch Agrobakterium auch binäre Vektoren (Mini-Ti-Plasmide) auf Pflanzen übertragen und in deren Genom 20 integriert werden. Die Agrobacterium-vermittelte Transformation ist am besten für dicotyledone, diploide Pflanzenzellen geeignet, wohingegen die direkten Transformationstechniken sich für jeden 25 Zelltyp eignen. Verfahren zur Agrobakterium vermittelten Transformation sind beispielsweise beschrieben bei Horsch RB et al. (1985) Science 225:1229f. Werden Agrobakterien verwendet, so ist die Expressionskassette in spezielle Plasmide zu integrieren, entweder in einen Zwischenvektor (englisch: shuttle or intermediate vector) oder einen binären Vektor. Wird ein Ti oder Ri 30 Plasmid zur Transformation verwendet werden soll, ist zumindest die rechte Begrenzung, meistens jedoch die rechte und die linke Begrenzung der Ti oder Ri Plasmid T-DNA als flankierende Region mit der einzuführenden Expressionskassette verbunden.

35 Für die Agrobacterium Tranformation werden bevorzugt binäre Vektoren verwendet. Binäre Vektoren können sowohl in E.coli als auch in Agrobacterium replizieren. Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen und einen Linker oder Polylinker flankiert von 40 der rechten und linken T-DNA Begrenzungssequenz. Sie können direkt in Agrobacterium transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol Gen Genet 163:181-187). Das Selektionsmarkergen erlaubt eine Selektion transformierter Agrobakteria und ist zum Beispiel das nptII Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht. Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende Agrobacterium sollte bereits ein Plasmid mit der vir-Region enthalten. Diese ist für die Übertragung der T-DNA auf die pflanzliche 45

Zelle erforderlich. Ein so transformiertes Agrobacterium kann zur Transformation pflanzlicher Zellen verwendet werden. Die Verwendung von T-DNA zur Transformation pflanzlicher Zellen ist intensiv untersucht und beschrieben (EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblaserdam, Chapter V; An et al. (1985) EMBO J 4:277-287). Verschiedene binäre Vektoren sind bekannt und teilweise kommerziell erhältlich wie zum Beispiel pBI101.2 oder pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc. USA; Bevan et al. (1984) Nucl Acids Res 12:8711), 10 pBinAR, pPZP200 oder pPTV.

Die mit einem solchen Vektor transformierten Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Raps, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschliessend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist beschrieben (White FF, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15 - 38; Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, S.128-143; Potrykus (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 42:205- 225). Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die integriert die oben beschriebenen erfindungsgemässen Expressionssysteme enthalten.

30 Stabil transformierte Zellen d.h. solche, die die eingeführte DNA integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten, können von untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Als Marker kann beispielhaft jedes Gen fungieren, dass eine Resistenz gegen Antibiotika oder Herbizide (wie Kanamycin, G418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin etc.) zu verleihen vermag (s.o.). Transformierte Zellen, die ein solches Markergen exprimieren, sind in der Lage, in der Gegenwart von Konzentrationen eines entsprechenden Antibiotikums oder Herbizides zu überleben, die einen untransformierten Wildtyp abtöten. Beispiel sind oben genannt und umfassen bevorzugt das bar Gen, dass Resistenz gegen das Herbizid Phosphinotricin verleiht. (Rathore KS et al. (1993) Plant Mol Biol 21(5):871-884), das nptII Gen, dass Resistenz gegen Kanamycin verleiht, das hpt Gen, das Resistenz gegen Hygromycin verleiht, 40 45 oder das EPSP-Gen, das Resistenz gegen das Herbizid Glyphosat verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion von transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986)

Plant Cell Reports 5:81-84). Die erhaltenen Pflanzen können in üblicher Weise gezüchtet und gekreuzt werden. Zwei oder mehr Generationen sollten vorzugsweise kultiviert werden, um sicherzustellen, dass die genomische Integration stabil und vererblich 5 ist.

Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft 10 von Kalluskulturen aus. Aus diesen noch undifferenzierten Zellmassen kann die Bildung von Spross und Wurzel in bekannter Weise induziert werden. Die erhaltenen Sprösslinge können ausgepflanzt und gezüchtet werden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Fennell et al. (1992) Plant Cell Rep. 11: 567-570; Stoeger et al 15 (1995) Plant Cell Rep. 14:273-278; Jahne et al. (1994) Theor Appl Genet 89:525-533).

Die Wirksamkeit der Expression der transgen exprimierten Nukleinsäuren kann beispielsweise *in vitro* durch Sprossmeristemvermehrung unter Verwendung einer der oben beschriebenen Selektionsmethoden ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression eines Zielgens und die Auswirkung auf den Phänotyp der Pflanze an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

25

II. Medizinische Anwendungen

Die erfindungsgemäß bereitgestellten dsRNA, Expressionssysteme oder Organismen eignen sich zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von menschlichen und tierischen Erkrankungen. Für eine effiziente Therapie ist es oft unzureichend nur ein einzelnes Zielgen zu vermindern. Das erfindungsgemäß Verfahren eignet sich insbesondere zur Behandlung von 30

35 - Pathogenbefall, wie beispielsweise virale oder bakterielle Erkrankungen. In diesen Fällen führen Ansätze, die lediglich gegen ein molekulares Ziel gerichtet sind, oft zu der Ausbildung von Resistenzen. Eine Kombinationstherapie, die mehrere Ziele abdeckt, ist jedoch kompliziert zu koordinieren und v.a. nur sehr aufwendig in klinischen Experimenten zu evaluieren. Das erfindungsgemäß Verfahren ermöglicht hier eine vorteilhafte Alternative. Die inhibitorische dsRNA kann dabei in der dem Fachmann geläufigen Weise appliziert werden. dsRNA verfügt über eine 40 erstaunliche Stabilität und effiziente Wirkung und kann beispielsweise durch Verfütterung entsprechender dsRNA exprimierenden Bakterien appliziert werden. Das Verfahren 45

5 eignet sich insbesondere zur Behandlung von viralen Infektionen z.B. mit dem "human immunodeficiency virus" (HIV), indem gleichzeitig die Expression von mindestens zwei viralen Gene vermindert wird, beispielsweise bei HIV von Genen wie gp41, die für den Zelleintritt verantwortlich sind, und der viralen Replikase oder reversen Transkriptase.

10 10 - Behandlung von Krebs (beispielsweise solider Tumore und/ oder Leukämien). Zahlreiche potentialle Zielgene sind hier dem Fachmann bekannt (z.B. Oncogene wie ABL1, BCL1, BCL2, BCL6, CBFA2, CBL, CSF1R, ERBA, ERBB, EBRB2, FGR, FOS, FYN, HRAS, JUN, LCK, LYN, MYB, MYC, NRAS, RET oder SRC; Tumorsuppressorgene wie BRCA1 oder BRCA2; Adhäsionsmoleküle; Cyclinekinasen und deren Inhibitoren).

15 20 Weitere potentiell mit dem erfindungsgemäßen Verfahren behandelbare Erkrankungen und die entsprechenden Zielgene sind dem Fachmann ohne weiteres zugänglich und umfassen beispielsweise Erkrankungen des Herz/Kreislaufsystems wie Bluthochdruck, Erkrankungen des zentralen oder peripheren Nervensystems wie Alzheimer, Parkinson oder multiple Sklerose usw. Auch ist es durch das erfindungsgemäße Verfahren möglich, mehr als eine Erkrankung parallel zu behandeln, wie beispielsweise ein 25 Herzkreislauferkrankung und eine Erkrankung des zentralen Nervensystems, was durch klassische Ansätze nicht möglich ist. Derartige Ansätze sind v.a. bei multiplen Erkrankungen wie sie oft im fortgeschrittenen Alter auftreten vorteilhaft. Beispielhaft sei die parallele Behandlung von Bluthochdruck 30 und z.B. Alzheimer oder seniler Demenz zu nennen. Dabei kann dieser Anwendungen als solche isoliert angewendet werden. Natürlich können auch mehr als eine der oben genannten Ansätze gleichzeitig angewendet werden. Dabei wird bei allen Anwendungen die Expression von mindestens zwei unterschiedlichen Zielgenen vermindert. Diese Zielgene können dabei aus der für 35 eine Anwendung bevorzugten Gruppe von Genen stammen oder aber auch unterschiedlichen Anwendungsgruppen zugeordnet sein.

III. Biotechnologische Anwendungen

40 40 Das erfindungsgemäße Verfahren lässt sich vorteilhaft in biotechnologischen Verfahren anwenden. Beispielhaft jedoch nicht einschränkend sei zu nennen die Optimierung von Stoffwechselwegen in fermentativ genutzten Hefen, Pilzen oder anderen eukaryotischen Mikroorganismen oder Zellen zur Herstellung von Feinchemikalien wie Aminosäuren (z.B. Lysin oder Methionin), Vitaminen (wie Vitamin B2, Vitamin C, Vitamin E), Carotinoi-

den, Ölen und Fetten, polyungesättigten Fettsäuren, Biotin usw. Dabei kann dieser Anwendungen als solche isoliert angewendet werden. Natürlich können auch mehr als eine der oben genannten Ansätze gleichzeitig angewendet werden. Dabei wird 5 bei allen Anwendungen die Expression von mindestens zwei unterschiedlichen Zielgenen vermindert. Diese Zielgene können dabei aus der für eine Anwendung bevorzugten Gruppe von Genen stammen oder aber auch unterschiedlichen Anwendungsgruppen zugeordnet sein.

10

Als Vektoren zur Expression in E.coli sind bevorzugt pQE70, pQE60 und pQE-9 (QIAGEN, Inc.); pBluescript Vektoren, Phagescript Vektoren, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene Cloning Systems, Inc.); ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia Biotech, Inc.).

Bevorzugte Vektoren zur eukaryotischen Expression umfassen 20 pWLNE0, pSV2CAT, pOG44, pXT1 und pSG (Stratagene Inc.); pSVK3, pBPV, pMSG und pSVL (Pharmacia Biotech, Inc.). Als induzierbare Vektoren seien pTet-tTak, pTet-Splice, pcDNA4/TO, pcDNA4/TO / LacZ, pcDNA6/TR, pcDNA4/TO/Myc-His /LacZ, pcDNA4/TO/Myc-His A, pcDNA4/TO/Myc-His B, pcDNA4/TO/Myc-His C, pVgRXR (Invitrogen, Inc.) oder die pMAM-Serie (Clontech, Inc.; GenBank Accession No.: U02443) zunennen. Diese stellen bereits das induzierbare regulat 25 orische Kontrollelement beispielsweise für eine chemisch, induzierbare Expression eines DSBI-Enzyms zur Verfügung. In diese Vektoren kann die Nukleinsäuresequenz kodierend für ein DSBI-Enzym direkt insertiert werden.

30 Vektoren für die Expression in Hefe umfassen beispielhaft pYES2, pYD1, pTEF1/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalph, pPIC9, pPIC3.5, PHIL-D2, PHIL-S1, pPIC3SK, pPIC9K, und PA0815 (Invitrogen, Inc.).

35 Vorteilhafte Kontrollsequenzen sind beispielsweise die gram-positiven Promotoren amy und SPO2, und die Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MFa, AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH.

40 Klonierungsvektoren und Techniken zur genetischen Manipulation von Ciliaten und Algen sind dem Fachmann bekannt (WO 98/01572; Falciatore et al. (1999) Marine Biotechnology 1(3):239-251; Dunahay et al. (1995) J Phycol 31:10004-1012).

45 Als Selektionsmarker können prinzipiell viele der auch für Pflanzen bevorzugten Selektionssysteme verwendet werden. Insbesondere bevorzugt sind für Säugerzelle die Neomycin (G418) Resistenz, die Hygromycin-Resistenz, die Zeocin-Resistenz oder die Puromycin-Re

49

sistenz. Für Prokaryoten ist insbesondere die Ampicillin-Resistenz, die Kanamycin-Resistenz oder die Tetracyclin-resistant bevorzugt.

5 Prinzipiell sind für die Transformation tierischer Zelle oder von Hefezellen ähnliche Verfahren wie für die "direkte" Transformation von pflanzlichen Zellen anzuwenden. Insbesondere Verfahren wie die Calciumphosphat oder Liposomen vermittelte Transformation oder aber Elektroporation sind bevorzugt.

10

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen, transgenen Organismen und der von ihnen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile - wie zum Beispiel bei transgenen pflanzlichen Organismen Wurzeln, Blätter etc.- , und transgenes Vermehrungsgut wie Saaten oder Früchte, zur Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln, Pharmazeutika oder Feinchemikalien, wie beispielsweise Enzymen, Vitaminen, Aminosäuren, Zucker, Fettsäuren, natürliche und synthetische Geschmacks-, Aroma- und Farbstoffe. Besonders bevorzugt ist die Produktion von Triacylglyceriden, Lipiden, Ölen, Fettsäuren, Stärke, Tocopherolen und Tocotrienolen sowie Carotinoiden. Von Menschen und Tieren verzehrbare erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanzen können auch beispielsweise direkt oder nach an sich bekannter Aufbereitung als Nahrungsmittel oder Futtermittel verwendet werden.

25

30

35

40

45

50

Sequenzen

1. SEQ ID NO: 1
5 Nukleinsäuresequenz kodierend für A.thaliana Albumin 2S sub-unit 1 (GenBank Acc.-No.: M22032)
2. SEQ ID NO: 2
10 Proteinsequenz kodierend für A.thaliana Albumin 2S subunit 1
- 10 3. SEQ ID NO: 3
15 Nukleinsäuresequenz kodierend für A.thaliana Albumin 2S sub-unit 3 (GenBank Acc.-No.: M22035)
4. SEQ ID NO: 4
15 Proteinsequenz kodierend für A.thaliana Albumin 2S subunit 3
5. SEQ ID NO: 5
20 Nukleinsäuresequenz kodierend für A.thaliana Albumin 2S sub-unit 2 (GenBank Acc.-No.: M22034)
6. SEQ ID NO: 6
25 Proteinsequenz kodierend für A.thaliana Albumin 2S subunit 2
7. SEQ ID NO: 7
25 Nukleinsäuresequenz kodierend für A.thaliana Albumin 2S sub-unit 4 (GenBank Acc.-No.: M22033)
8. SEQ ID NO: 8
30 Proteinsequenz kodierend für A.thaliana Albumin 2S subunit 4
9. SEQ ID NO: 9
30 Nukleinsäuresequenz kodierend für B.napus Cruciferin Speicherprotein (GenBank Acc.-No.: X59294)
- 35 10. SEQ ID NO: 10
35 Proteinsequenz kodierend für B.napus Cruciferin Speicherprotein
11. SEQ ID NO: 11
40 Nukleinsäuresequenz kodierend für Brassica napus Cruciferin (GenBank Acc.-No.: X14555)
12. SEQ ID NO: 12
45 Proteinsequenz kodierend für Brassica.napus Cruciferin

13. SEQ ID NO: 13
Nukleinsäuresequenz kodierend für B.napus BnC2 Cruciferin Speicherprotein (GenBank Acc.-No.: X59295)
- 5 14. SEQ ID NO: 14
Proteinsequenz kodierend für B.napus BnC2 Cruciferin Speicherprotein
- 10 15. SEQ ID NO: 15
partielle Nukleinsäuresequenz kodierend für B.napus Cruciferin cru4 subunit (GenBank Acc.-No.: X57848)
- 15 16. SEQ ID NO: 16
partielle Proteinsequenz kodierend für B.napus Cruciferin cru4 subunit
- 20 17. SEQ ID NO: 17
Nukleinsäuresequenz kodierend für B.napus cru1 Cruciferin subunit (GenBank Acc.-No.: X62120)
18. SEQ ID NO: 18
Proteinsequenz kodierend für B.napus cru1 Cruciferin subunit
- 25 19. SEQ ID NO: 19
Nukleinsäuresequenz kodierend für Glycinin A-1a-B-x subunit aus des Sojabohne (GenBank Acc.-No.: M36686)
- 30 20. SEQ ID NO: 20
Proteinsequenz kodierend für Glycinin A-1a-B-x subunit aus des Sojabohne
21. SEQ ID NO: 21
Nukleinsäuresequenz kodierend für Sojabohne Glycinin subunit G2 (GenBank Acc.-No.: X15122)
- 35 22. SEQ ID NO: 22
Proteinsequenz kodierend für Sojabohne Glycinin subunit G2
23. SEQ ID NO: 23
40 Nukleinsäuresequenz kodierend für Sojabohne A5A4B3 Glycinin subunits (GenBank Acc.-No.: X02626)
- 45 24. SEQ ID NO: 24
Proteinsequenz kodierend für Sojabohne A5A4B3 Glycinin subunits

25. SEQ ID NO: 25
Nukleinsäuresequenz kodierend für Sojabohne (G.max) Glycinin Speicherprotein subunit A3-B4 (GenBank Acc.-No.: M10962)

5 26. SEQ ID NO: 26
Proteinsequenz kodierend für Sojabohne (G.max) Glycinin Speicherprotein subunit A3-B4

27. SEQ ID NO: 27
10 Nukleinsäuresequenz kodierend für Sojabohne Glycinin subunit G3 (GenBank Acc.-No.: X15123)

28. SEQ ID NO: 28
15 Proteinsequenz kodierend für Sojabohne Glycinin subunit G3

29. SEQ ID NO: 29
Nukleinsäuresequenz kodierend für Sonnenblume 11S Speicherprotein (G3-D1) (GenBank Acc.-No.: M28832)

20 30. SEQ ID NO: 30
Proteinsequenz kodierend für Sonnenblume 11S Speicherprotein (G3-D1)

31. SEQ ID NO: 31
25 Nukleinsäuresequenz kodierend für Raps (B.napus) Napin (GenBank Acc.-No.: J02586)

32. SEQ ID NO: 32
30 Proteinsequenz kodierend für Raps (B.napus) Napin

33. SEQ ID NO: 33
Nukleinsäuresequenz kodierend für Brassica juncea 2S Speicherprotein (GenBank Acc.-No.: X65040)

35 34. SEQ ID NO: 34
Proteinsequenz kodierend für Brassica juncea 2S Speicherprotein

35. SEQ ID NO: 35
40 Nukleinsäuresequenz kodierend für Brassica oleracea 2S Speicherprotein (GenBank Acc.-No.: X65038)

36. SEQ ID NO: 36
45 Proteinsequenz kodierend für Brassica oleracea 2S Speicherprotein

37. SEQ ID NO: 37
Nukleinsäuresequenz kodierend für Brassica napus cv. Topas Napin (GenBank Acc.-No.: U04945)

5 38. SEQ ID NO: 38
Proteinsequenz kodierend für Brassica napus cv. Topas Napin

39. SEQ ID NO: 39
partielle Nukleinsäuresequenz kodierend für Sinapis alba sin1
10 Speicherprotein (GenBank Acc.-No.: X91799)

40. SEQ ID NO: 40
partielle Proteinsequenz kodierend für Sinapis alba sin1
Speicherprotein

15 41. SEQ ID NO: 41
Nukleinsäuresequenz kodierend für Sojabohne (Glycine max) napin-type 2S Albumin 1 (GenBank Acc.-No.: U71194)

20 42. SEQ ID NO: 42
Proteinsequenz kodierend für Sojabohne (Glycine max) napin-type 2S Albumin 1

43. SEQ ID NO: 43
25 Nukleinsäuresequenz kodierend für Sojabohne (Glycine max) 2S Albumin (GenBank Acc.-No.: AF005030)

44. SEQ ID NO: 44
30 Proteinsequenz kodierend für Sojabohne (Glycine max) 2S Albumin

45. SEQ ID NO: 45
Nukleinsäuresequenz kodierend für Brassica nigra 2S Speicherprotein (GenBank Acc.-No.: X65039)

35 46. SEQ ID NO: 46
Proteinsequenz kodierend für Brassica nigra 2S Speicherprotein

40 47. SEQ ID NO: 47
Nukleinsäuresequenz kodierend für Sinapis alba sin5 Speicherprotein (GenBank Acc.-No.: X91798)

48. SEQ ID NO: 48
45 Proteinsequenz kodierend für Sinapis alba sin5 Speicherprotein

49. SEQ ID NO: 49
Nukleinsäuresequenz kodierend für Sonnenblume HaG5 2 S Albumin (GenBank Acc.-No.: X06410)

5 50. SEQ ID NO: 50
proteinsequenz kodierend für Sonnenblume HaG5 2 S Albumin

10 51. SEQ ID NO: 51
partielle Nukleinsäuresequenz kodierend für Sonnenblume (Helianthus annuus) 2S Albumin (GenBank Acc.-No.: X76101)

15 52. SEQ ID NO: 52
partielle Proteinsequenz kodierend für Sonnenblume (Helianthus annuus) 2S Albumin

20 53. SEQ ID NO: 53
Nukleinsäuresequenz kodierend für dsRNA zur Suppression von Arabidopsis thaliana 12S Speicherprotein AtCru3 (Insert von Vektor pCR2.1-AtCRU3-RNAi)

25 54. SEQ ID NO: 54
Ribonukleinsäuresequenz kodierend für dsRNA zur Suppression von Arabidopsis thaliana 12S Speicherprotein AtCru3

30 55. SEQ ID NO: 55
Nukleinsäuresequenz kodierend für dsRNA zur Suppression von Arabidopsis thaliana 12S Speicherprotein AtCra1

35 56. SEQ ID NO: 56
Ribonukleinsäuresequenz kodierend für dsRNA zur Suppression von Arabidopsis thaliana 12S Speicherprotein AtCra1

40 57. SEQ ID NO: 57
Nukleinsäuresequenz kodierend für dsRNA zur Suppression von Arabidopsis thaliana 2S Speicherprotein At2S2

58. SEQ ID NO: 58
Ribonukleinsäuresequenz kodierend für dsRNA zur Suppression von Arabidopsis thaliana 2S Speicherprotein At2S2

45 59. SEQ ID NO: 59
Nukleinsäuresequenz kodierend für Arabidopsis thaliana 12S Cruciferin Speicherprotein (ATCRU3; GenBank Acc.-No.: U66916)

60. SEQ ID NO: 60

Proteinsequenz kodierend für *Arabidopsis thaliana* 12S Cruciferin Speicherprotein (ATCRU3)

5 61. SEQ ID NO: 61

Nukleinsäuresequenz kodierend für *A.thaliana* 12S Speicherprotein (CRA1; GenBank Acc.-No.: M37247)

62. EQ ID NO: 62

10 Proteinsequenz kodierend für *A.thaliana* 12S Speicherprotein (CRA1)

63. SEQ ID NO: 63

15 Nukleinsäuresequenz kodierend für *Arabidopsis thaliana* 12S Speicherprotein AT5g44120/MLN1_4 (GenBank Acc.-No.: AY070730)

64. SEQ ID NO: 64

Proteinsequenz kodierend für *Arabidopsis thaliana* 12S Speicherprotein AT5g44120/MLN1_4

20

65. SEQ ID NO: 65

Nukleinsäuresequenz kodierend für *Arabidopsis* 12S Speicherprotein (CRB; GenBank Acc.-No.: X14313; M37248)

25 66. SEQ ID NO: 66

Proteinsequenz kodierend für *Arabidopsis* 12S Speicherprotein (CRB)

67. SEQ ID NO: 67

30 Nukleinsäuresequenz kodierend für *Arabidopsis thaliana* putatives 12S Speicherprotein (aus GenBank Acc.-No.: AC003027)

68. SEQ ID NO: 68

35 Proteinsequenz kodierend für *Arabidopsis thaliana* putatives Speicherprotein (Protein_id="AAD10679.1")

69. SEQ ID NO: 69

40 Nukleinsäuresequenz kodierend für *Arabidopsis thaliana* Cruciferin 12S Speicherprotein (At1g03890) (GenBank Acc.-No.: AY065432)

70. SEQ ID NO: 70

Proteinsequenz kodierend für *Arabidopsis thaliana* Cruciferin 12S Speicherprotein (At1g03890)

56

71. SEQ ID NO: 71
Nukleinsäuresequenz kodierend für *Arabidopsis thaliana* Prohibitin 1 (Atphb1) (GenBank Acc.-No.: U66594)

5 72. SEQ ID NO: 72
Proteinsequenz kodierend für *Arabidopsis thaliana* Prohibitin 1 (Atphb1)

10 73. SEQ ID NO: 73 Oligonukleotidprimer OPN1

74. SEQ ID NO: 74 Oligonukleotidprimer OPN2

75. SEQ ID NO: 75 Oligonukleotidprimer OPN3

15 76. SEQ ID NO: 76 Oligonukleotidprimer OPN4

77. SEQ ID NO: 77 Oligonukleotidprimer OPN5

78. SEQ ID NO: 78 Oligonukleotidprimer OPN6

20 79. SEQ ID NO: 79 Oligonukleotidprimer OPN7

80. SEQ ID NO: 80 Oligonukleotidprimer OPN8

25 81. SEQ ID NO: 81 Oligonukleotidprimer OPN9

82. SEQ ID NO: 82 Oligonukleotidprimer OPN10

83. SEQ ID NO: 83

30 Nukleinsäuresequenz kodierend für sRNAi4-dsRNA zur Suppression mehrerer Speicherproteine

84. SEQ ID NO: 84
35 Ribonukleinsäuresequenz kodierend für sRNAi4-dsRNA zur Suppression mehrerer Speicherproteine

85. SEQ ID NO: 85
Nukleinsäuresequenz kodierend für sRNAi8-dsRNA zur Suppression mehrerer Speicherproteine

40 86. SEQ ID NO: 86
Ribonukleinsäuresequenz kodierend für sRNAi8-dsRNA zur Suppression mehrerer Speicherproteine

45 87. SEQ ID NO: 87 Oligonukleotidprimer OPN11

57

88. SEQ ID NO: 88 Oligonukleotidprimer OP12

89. SEQ ID NO: 89 Oligonukleotidprimer OPN13

5 90. SEQ ID NO: 90 Oligonukleotidprimer OPN15

91. SEQ ID NO: 91 Oligonukleotidprimer OPN16

92. SEQ ID NO: 92 Oligonukleotidprimer OPN17

10 93. SEQ ID NO: 93 Nukleinsäuresequenz kodierend für *Arabidopsis thaliana* "globulin-like protein" (GenBank Acc.-No.: NM_119834)

15 94. SEQ ID NO: 94 Proteinsequenz kodierend für *Arabidopsis thaliana* "globulin-like protein" (Protein_id="NP_195388.1")

95. SEQ ID NO: 95 Nukleinsäuresequenz kodierend für *Glycine max* 7S Samenglobulin (GenBank Acc.-No.: U59425)

20 96. SEQ ID NO: 96 Proteinsequenz kodierend für *Glycine max* 7S Samenglobulin

25 97. SEQ ID NO: 97 Nukleinsäuresequenz kodierend für *Zea mays* 19kD Zein (GenBank Acc.-No.: E01144)

30 98. SEQ ID NO: 98 Proteinsequenz kodierend für *Zea mays* 19kD Zein

99. SEQ ID NO: 99 Nukleinsäuresequenz kodierend für *Zea mays* 19kD alpha Zein B1

35 35 (GenBank Acc.-No.: AF371269)

100. SEQ ID NO: 100 Proteinsequenz kodierend für *Zea mays* 19kD alpha Zein B1

40 101. SEQ ID NO: 101 Nukleinsäuresequenz kodierend für *Zea mays* 19kD alpha Zein B2

(GenBank Acc.-No.: AF371270)

102. SEQ ID NO: 102

45 Proteinsequenz kodierend für *Zea mays* 19kD alpha Zein B2

103. SEQ ID NO: 103
Nukleinsäuresequenz kodierend für Zea mays 22kD alpha-zein
(GenBank Acc.-No.: X61085)

5 104. SEQ ID NO: 104
Proteinsequenz kodierend für Zea mays 22kD alpha-zein

105. SEQ ID NO: 105
Nukleinsäuresequenz kodierend für Oryza sativa Prolamin
10 (GenBank Acc.-No.: AB016503)

106. SEQ ID NO: 106
Proteinsequenz kodierend für Oryza sativa Prolamin

15 107. SEQ ID NO: 107
Nukleinsäuresequenz kodierend für A.sativa Avenin (GenBank
Acc.-No.: M38446)

20 108. SEQ ID NO: 108
Proteinsequenz kodierend für A.sativa Avenin

109. SEQ ID NO: 109
Nukleinsäuresequenz kodierend für Hordeum vulgare C-Hordein
(GenBank Acc.-No.: M36941)

25 110. SEQ ID NO: 110
Proteinsequenz Teil 1 kodierend für Hordeum vulgare C-Hordein

111. SEQ ID NO: 111
30 Proteinsequenz Teil 2 kodierend für Hordeum vulgare C-Hordein

112. SEQ ID NO: 112
Nukleinsäuresequenz kodierend für Triticum aestivum LMW Glu-
tenin-1D1 (GenBank Acc.-No.: X13306)

35 113. SEQ ID NO: 113
Proteinsequenz kodierend für Triticum aestivum LMW Glute-
nin-1D1

40 114. SEQ ID NO: 114
Binärer Expressionsvektor für Agrobakterium vermittelte
Pflanzentransformation pSUN2-USP.

115. SEQ ID NO: 115

Partielle Nukleinsäuresequenz kodierend für Homogentisat-1,2-dioxygenase aus *Brassica napus* (HGD; EC-Nr.: 1.13.11.5)

5

116. SEQ ID NO: 116

Nukleinsäuresequenz kodierend für Homogentisat-1,2-dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* (HGD; EC-Nr.: 1.13.11.5)

10 117. SEQ ID NO: 117

Proteinsequenz kodierend für Homogentisat-1,2-dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* (HGD; EC-Nr.: 1.13.11.5)

118. SEQ ID NO: 118

15 Nukleinsäuresequenz kodierend für Maleylacetoacetatisomerase aus *Arabidopsis thaliana* (MAAI; EC-Nr.: 5.2.1.2.)

119. SEQ ID NO: 119

20 Proteinsequenz kodierend für Maleylacetoacetatisomerase aus *Arabidopsis thaliana* (MAAI; EC-Nr.: 5.2.1.2.)

120. SEQ ID NO: 120

Nukleinsäuresequenz kodierend für Fumarylacetoacetathiolase aus *Arabidopsis thaliana* (FAAH; EC-Nr.: 3.7.1.2)

25

121. SEQ ID NO: 121

Proteinsequenz kodierend für Fumarylacetoacetathiolase aus *Arabidopsis thaliana* (FAAH; EC-Nr.: 3.7.1.2)

30 122. SEQ ID NO: 122

Nukleinsäuresequenz kodierend für Suppressionskonstrukt 2 (p3300.1-Toc159-GFP-RNAi)

35 123. SEQ ID NO: 123

Oligonukleotidprimer OPN18

124. SEQ ID NO: 124

Oligonukleotidprimer OPN19

125. SEQ ID NO: 125

Oligonukleotidprimer OPN20

40

126. SEQ ID NO: 126

Oligonukleotidprimer OPN21

Abbildungen

45 1. Fig.1: Schematische Darstellung der Speicherprotein-Suppressionskonstrukte.

60

Insert aus Vektor pCR2.1-sRNAi4 (1) (vgl. Beispiel 2d) und pCR2.1-sRNAi8 (2) (vgl. Beispiel 2e) kodierend für eine die AtCru3-, AtCRB und At2S3-Expression supprimierende dsRNA.

5 In den beiden Konstrukten sind die "sense"-Ribonukleotidsequenzen und die komplementären "antisense"-Ribonukleotidsequenzen (symbolisiert durch auf dem Kopf stehende Buchstaben) für die einzelnen zu supprimierenden Zielgene (AtCru3; AtCRB, At2S3) unterschiedlich angeordnet. Schraffierte Bereiche (I1, 10 I2 etc.) stellen Intronsequenzen (Linker) dar.

2. Fig.2A-D: Symbolische Darstellung verschiedener dsRNAs in ihrer Sekundärstruktur.

15 S1, S2, ... S(n): "sense"-Ribonukleotidsequenz
AS1, AS2, ... AS(n): "antisense"-Ribonukleotidsequenz
I: Intronsequenz

20 Die Anordnung der einzelnen "sense"-Ribonukleotidsequenzen und "antisense"-Ribonukleotidsequenzen kann so erfolgen, dass zunächst alle "sense"-Ribonukleotidsequenzen aneinander gereiht werden und so quasi einen "sense"-Strang bilden, wodrauf dann alle "antisense"-Ribonukleotidsequenzen aneinander zu einem "antisense"-Strang zusammengefügt werden (A und C).

25 Alternativ kann die Anordnung der einzelnen "sense"-Ribonukleotidsequenzen und "antisense"-Ribonukleotidsequenzen so erfolgen, dass Paare von jeweils komplementären "sense"-Ribonukleotidsequenzen und "antisense"-Ribonukleotidsequenzen aneinander gefügt werden (B und D).

30 "sense"-Ribonukleotidsequenzen und "antisense"-Ribonukleotidsequenzen können direkt aneinandergesetzt sein (A und B) oder aber durch weitere Sequenzen beispielsweise Introns (I) von einander getrennt sein (C und D).

3. Fig.3A-C: Symbolische Darstellung verschiedener dsRNAs in ihrer Sekundärstruktur.

40 S1, S2, ... S(n): "sense"-Ribonukleotidsequenz
AS1, AS2, ... AS(n): "antisense"-Ribonukleotidsequenz
SP: "SPACER"
RE: Erkennungssequenz für Ribozym
R: Ribozym

45

61

"sense"-Ribonukleotidsequenzen und "antisense"-Ribonukleotidsequenzen können durch weitere Sequenzen ("SPACER"; SP) von einander getrennt sein (A). Der Spacer kann beispielsweise einer Erkennungssequenz für ein Ribozym sein. Das korrespondierende Ribozym kann separat exprimiert werden (B) oder aber auch ebenfalls von dem Spacer kodiert sein (C).

4. Fig.4: Abbildung des Suppressionskonstrukts mit den entsprechenden Restriktionsenzymeschnittstellen:

10

5. Fig.5A: Identifikation einer Pflanze, die den Albino-Phänotyp zeigt (links). Der Phänotyp ist identisch zur ppi2 Mutante, die Toc159 nicht mehr exprimieren kann. Als Kontrolle Pflanzen mit Wildtyp Phänotyp, die parallel gewachsen sind.

15

Fig. 5B: Fluoreszenz-Analyse der Pflanzen aus Fig.5A. Anregung der Fluoreszenz durch Licht im Wellenlängenbereich 470-490 nm. Es wurde dieselbe Vergrösserung gewählt wie in Fig.5A.

20

25

30

35

40

45

Beispiele

Allgemeine Methoden:

5 Alle Chemikalien, wenn nicht anders erwähnt, stammen von den Firmen Fluka (Buchs), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen). Restriktionsenzyme, DNA-modifizierende Enzyme und Molekularbiologie-Kits wurden von den Firmen Amersham-Pharmacia (Freiburg), Biometra (Göttingen), Roche 10 (Mannheim), New England Biolabs (Schwalbach), Novagen (Madison, Wisconsin, USA), Perkin-Elmer (Weiterstadt), Qiagen (Hilden), Stratagen (Amsterdam, Niederlande), Invitrogen (Karlsruhe) und Ambion (Cambridgeshire, United Kingdom). Die verwendeten Reagenzien wurden entsprechend der Angaben des Herstellers eingesetzt.

15 Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungs- 20 schritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarosegelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA werden 25 wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt. Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467).

30

Beispiel 1: Allgemeine Verfahren

Die Pflanze *Arabidopsis thaliana* repräsentiert ein Mitglied der 35 höheren Pflanzen (Samenpflanzen). Diese Pflanze ist eng verwandt mit anderen Pflanzenarten aus der Familie der Cruciferen wie z.B. *Brassica napus*, aber auch mit anderen Pflanzenfamilien der Dikotyledonen. Aufgrund des hohen Grades an Homologie ihrer DNA-Sequenzen bzw. Polypeptidsequenzen kann *Arabidopsis thaliana* als 40 Modellpflanze für andere Pflanzenarten eingesetzt werden.

a) Anzucht von *Arabidopsis* Pflanzen

Die Pflanzen werden entweder auf Murashige-Skoog Medium mit 0,5 % 45 Saccharose (Ogas et al. (1997) Science 277:91-94) oder auf Erde gezogen (Focks & Benning (1998) Plant Physiol 118:91-101). Um einheitliche Keimungs- und Blühzeiten zu erreichen, werden die

Samen nach Ausplattieren bzw. Ausstreuen auf Erde zwei Tage bei 4° C stratifiziert. Nach der Blüte werden die Schoten markiert. Entsprechend der Markierungen werden dann Schoten mit einem Alter von 6 bis 20 Tagen nach der Blüte geerntet.

5

b) Isolierung von total RNA und poly-A⁺ RNA aus Pflanzen

Für die Herstellung von Suppressionskonstrukten wird RNA bzw. polyA⁺ RNA isoliert. RNA wurde aus Schoten von *Arabidopsis* Pflanzen nach folgender Vorschrift isoliert: Schotenmaterial im Alter von 6 bis 20 Tage nach Blüte wurde geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Material wurde vor der weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. 75 mg des Materials wurde im gekühlten Mörser zu einem feinem Pulver gemahlen und mit 200 µL des Lysis-Puffers aus dem Ambion RNAqueos-Kit versetzt. Die Isolierung der totalen RNA wurde dann nach Herstellerangaben durchgeführt. Die RNA wurde mit 50 µL Elutionspuffer (Ambion) eluiert und die Konzentration durch Absorption einer 1 zu 100 verdünnten Lösung am Photometer (Eppendorf) bei 260 nm bestimmt. 40 µg/ml RNA entspricht dabei einer Absorption von 1. Die RNA-Lösungen wurden mit RNase freiem Wasser auf eine Konzentration von 1 µg/µL eingestellt. Die Konzentrationen wurden durch Agarosegelektrophorese überprüft. Zur Isolierung von polyA⁺ RNA wurde oligo(dT)-Zellulose von Amersham Pharmacia nach Herstellerangaben verwendet. RNA bzw. polyA⁺ RNA wurde bei -70°C gelagert.

c) Konstruktion der cDNA-Bank

Zur Konstruktion der cDNA-Bank aus *Arabidopsis* Schoten-RNA wurde die Erststrangsynthese unter Verwendung von Reverser Transkriptase aus Maus-Leukämie-Virus (Clontech) und Oligo-d(T)-Primern, die Zweitstrangsynthese durch Inkubation mit DNA-Polymerase I, Klenow-Enzym und RNase H-Spaltung bei 12°C (2 Std.), 16°C (1 Std.) und 22°C (1 Std.) erzielt. Die Reaktion wurde durch Inkubation bei 65°C (10 min) gestoppt und anschließend auf Eis überführt. Doppelsträngige DNA-Moleküle wurde mit T4-DNA-Polymerase (Roche, Mannheim) bei 37°C (30 min) mit glatten Enden versehen. Die Nukleotide wurden durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Sephadex-G50-Zentrifugiersäulen entfernt. EcoRI/XhoI-Adapter (Pharmacia, Freiburg, Deutschland) wurden mittels T4-DNA-Ligase (Roche, 12°C, über Nacht) an die cDNA-Enden ligiert, mit XhoI nachgeschnitten und durch Inkubation mit Polynukleotidkinase (Roche, 37°C, 30 min) phosphoryliert. Dieses Gemisch wurde der Trennung auf einem Low-Melting-Agarose-Gel unterworfen. DNA-Moleküle über 300 Basenpaaren wurden aus dem Gel eluiert, Phenol-extrahiert, auf Elutip-D-Säulen (Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland) konzentriert und an Vektorarme ligiert und in lambda-ZAPII-Phagen

64

oder lambda-ZAP-Express-Phagen unter Verwendung des Gigapack Gold-Kits (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) verpackt, wobei Material des Herstellers verwendet und seine Anweisungen befolgt wurden.

5

d) Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* oder *Brassica napus* (CTAB-Methode)

Zur Isolierung genomischer DNA aus Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* oder *Brassica napus* werden ca. 0,25 g Blattmaterial junger Pflanzen im vegetativen Stadium in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert. Das pulverisierte Pflanzenmaterial wird zusammen mit 1 ml 65°C-warmem CTAB I-Puffer (CTAB: Hexadecyltrimethylammoniumbromid, auch genannt Cetyltrimethylammoniumbromid; Sigma Kat.-Nr.: H6269) und 20 µl β-Mercaptoethanol in einen vorgewärmten zweiten Mörser gegeben und nach vollständiger Homogenisierung wird der Extrakt in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und für 1 h bei 65°C unter regelmäßiger, vorsichtiger Durchmischung inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird der Ansatz mit 1 ml Chloroform/Octanol (24:1, mit 1M Tris/HCl, pH 8,0 ausgeschüttelt) durch langsames Invertieren extrahiert und zur Phasentrennung für 5 min bei 8,500 rpm (7,500 x g) und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wird die wässrige Phase erneut mit 1 ml Chloroform/Octanol extrahiert, zentrifugiert und durch Invertieren mit 1/10 Volumen auf 65°C vorgewärmtem CTAB II-Puffer sorgfältig gemischt. Anschließend wird der Ansatz durch vorsichtiges Schwenken mit 1 ml Chloroform/Octanol-Gemisch (siehe oben) versetzt und zur erneuten Phasentrennung für 5 min bei 8,500 rpm (7,500 x g) und Raumtemperatur zentrifugiert. Die wässrige untere Phase wird in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und die obere organische Phase wird in einem frischen Eppendorf-Gefäß erneut für 15 min bei 8,500 rpm (7,500 x g) und Raumtemperatur zentrifugiert. Die hieraus resultierende wässrige Phase wird mit der wässrigen Phase des vorherigen Zentrifugationsschrittes vereinigt und der gesamte Ansatz mit exakt demselben Volumen vorgewärmtem CTAB III-Puffer versetzt. Es folgt eine Inkubation bei 65°C, bis die DNA in Flocken ausfällt. Dies kann bis zu 1 h dauern oder durch Inkubation bei 37°C über Nacht erfolgen. Das aus dem anschließenden Zentrifugationsschritt (5 min, 2000 rpm (500 x g), 4°C) resultierende Sediment wird mit 250 µl auf 65°C vorgewärmtem CTAB IV-Puffer versetzt und für mindestens 30 min bzw. bis zur vollständigen Auflösung des Sediments bei 65°C inkubiert. Anschließend wird die Lösung zur Fällung der DNA mit 2,5 Volumina eiskaltem Ethanol vermischt und für 1h bei -20°C inkubiert. Alternativ kann der Ansatz mit 0,6 Volumina Isopropanol vermischt und ohne weitere Inkubation sofort für 15 min bei 8,500 rpm (7,500 x g) und 4°C zentrifugiert werden. Die sedimentierte DNA wird durch

65

Invertieren des Eppendorf-Gefäßes zweimal mit je 1 ml 80%igem eiskaltem Ethanol gewaschen, nach jedem Waschschritt erneut zentrifugiert (5 min, 8,500 rpm (7,500 x g), 4°C) und anschließend für ca. 15 min luftgetrocknet. Abschließend wird die DNA in

5 100 µl TE mit 100 µg/ml RNase resuspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA Lösung ist nach einer weiteren Inkubationsphase über Nacht bei 4°C homogen und kann für weiterführende Experimente verwendet werden.

10 Lösungen für CTAB:

Lösung I (für 200 ml):

100 mM Tris/HCl pH 8,0 (2,42 g)

1,4 M NaCl (16,36 g)

15 20 mM EDTA (8,0 ml von 0,5 M Stammlösung)
2 % (w/v) CTAB (4,0 g)

Jeweils vor der Verwendung werden frisch zugesetzt:

2 % β -Mercaptoethanol (20 µl für 1 ml Lösung I).

20 Lösung II (für 200 ml):
0,7 M NaCl (8,18 g)

10 % (w/v) CTAB (20 g)

25 Lösung III (für 200 ml):

50 mM Tris/HCl pH 8,0 (1,21 g)

10 mM EDTA (4 ml 0,5 M von 0,5 M Stammlösung)

1 % (w/v) CTAB (2,0 g)

30 Lösung IV (High-salt TE) (für 200 ml):

10 mM Tris/ HCl pH 8,0 (0,242 g)

0,1 mM EDTA (40 µl 0,5 M Stammlösung)

1 M NaCl (11, 69 g)

35 Chloroform/Octanol (24:1) (für 200 ml):

192 ml Chloroform

8 ml Octanol

Die Mischung wird 2x mit 1 M TrisHCl pH 8,0 ausgeschüttelt und vor Licht geschützt gelagert.

40 Beispiel 2: Herstellung von Suppressionskonstrukten

Ausgehend von der genomischer *Arabidopsis thaliana* DNA oder cDNA wurden über PCR mittels der aufgeführten Oligonukleotide folgende

45 Fragmente von Speicherproteinsequenzen amplifiziert. Dabei kam nachfolgendes PCR Protokoll zum Einsatz:

66

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

5,00 µL Template cDNA oder genomische DNA (ca. 1 µg)
5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25 mM MgCl₂
5 5,00 µL 2mM dNTP
1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)
0,50 µL Advantage-Polymerase (Clontech)

PCR-Programm: Anfangsdenaturierung für 2 min bei 95°C, dann 35 Zy-
10 klen mit 45. sec 95°C, 45 sec 55°C und 2 min 72°C. Abschliessende Extension von 5 min bei 72°C.

a) Ausgangsvektor pCR2.1-AtCRU3-RNAi

15 Aus genomischer *Arabidopsis thaliana* DNA wird mit nachfolgendem Oligonukleotid-Primerpaar ein Exonbereich mit dem vollständigen anschließenden Intron einschließlich der an das Intron anschließenden Spleiß-Akzeptorsequenz des 12S Speicherprotein AtCRU3 (Basenpaar 1947 bis 2603 der Sequenz mit der GenBank Acc.-No: 20 U66916) amplifiziert:

ONP1 (SEQ ID NO: 134):

5'-ATAAGAATGCGGCCGCGTGTCCATTGGCCGGAAACAAAC-3'

25 ONP2 (SEQ ID NO: 135):

5'-CCCGGATCCTCTGTAAACATTGACAAACATG-3'

Das PCR-Produkt wird in den pCR2.1-TOPO Vektor (Invitrogen) gemäss Herstellerangaben kloniert, resultierend in dem pCR2.1-1 30 Vektor und die Sequenz überprüft.

Für die den antisense-Strang der dsRNA kodierende Sequenz wird aus *Arabidopsis thaliana* cDNA lediglich das gleiche Exon wie oben (Basenpaar 1947 bis 2384) mit dem nachfolgenden Primerpaar amplifiziert:

ONP3 (SEQ ID NO: 136):

5'-ATAAGAATGCGGCCGCGTGTCCATTGGCCGGAAACAAAC-3'

40 ONP4 (SEQ ID NO: 137):

5'-ATAAGAATGCGGCCGCGGATCCACCCCTGGAGAACGCCACGAGTG-3'

Das PCR-Produkt wird in den pCR2.1-TOPO Vektor (Invitrogen) gemäss Herstellerangaben kloniert, resultierend in dem pCR2.1-2 45 Vektor und die Sequenz überprüft.

0,5 µg von Vektor pCR2.1-1 werden mit dem Restriktionsenzym BamHI (New England Biolabs) für 2 Stunden nach Herstellerangaben inkubiert und dann für 15 min mit alkalischer Phosphatase (New England Biolabs) dephosphoryliert. Der so präparierte Vektor (1 µL) wird dann mit dem aus Vektor pCR2.1-2 gewonnenen Fragment ligiert. Dazu werden 0,5 µg von Vektor pCR2.1-2 2 Stunden mit BamHI (New England Biolabs) verdaut und die DNA-Fragmente per Gelelektrophorese aufgetrennt. Das neben dem Vektor (3,9 kb) entstandene 489 bp grosse Stück wird aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem "Gelpurification"-Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt und mit 50 µL Elutionspuffer eluiert. 10 µL des Eluats werden mit Vektor pCR2.1-1 (s.o.) über Nacht bei 16°C ligiert (T4 Ligase, New England Biolabs). Die Ligationsprodukte werden dann in TOP10 Zellen (Stratagene) nach Herstellerangaben transformiert und entsprechend selektioniert. Positive Klone werden mit dem Primerpaar ONP1 und ONP2 durch PCR verifiziert. Der erhaltene Vektor wird pCR2.1-AtCRU3-RNAi genannt. Die für die dsRNA kodierende Nukleinsäuresequenz ist durch SEQ ID NO: 105 beschrieben.

20 b) Ausgangsvektor pCR2.1-AtCRB-RNAi

Mit nachfolgendem Oligonukleotid-Primerpaar wird ein Exonbereich des 12S Speicherprotein AtCRB (SEQ ID NO: 117 bzw. 118; Basenpaar 601 bis 1874 der Sequenz mit der GenBank Acc.-No: M37248) aus *Arabidopsis thaliana* cDNA amplifiziert:

ONP5 (SEQ ID NO: 138):

5' ATAAGAATGCGGCCGCGATCCCTCAGGGTCTTCTTGCCCACT-3'

30 ONP6 (SEQ ID NO: 139):

5' -CCGCTCGAGTTACGGATGGAGCCACGAAG-3'

Das PCR-Produkt wird in den pCR2.1-TOPO Vektor (Invitrogen) gemäss Herstellerangaben kloniert, resultierend in dem pCR2.1-3 Vektor und die Sequenz überprüft.

35 Für den als Linker fungierenden Bereich wird aus *Arabidopsis thaliana* genomicischer DNA ein Intron mit den entsprechenden Spliceakzeptor und -donorsequenzen der flankierenden Exons (Basenpaar 1874 bis 2117 der Sequenz mit der GenBank Acc.-No: M37248) mit dem nachfolgenden Primerpaar amplifiziert:

ONP7 (SEQ ID NO: 140):

5' -CCGCTCGAGGTAAGCTAACAAATCTTAG-3'

45 ONP8 (SEQ ID NO: 141):

5' -ACGCGTCGACGCGTTCTGCGTGCAAGATATT-3'

Das PCR-Produkt wird in den pCR2.1-TOPO Vektor (Invitrogen) gemäss Herstellerangaben kloniert, resultierend in dem pCR2.1-4 Vektor und die Sequenz überprüft.

5 Das Konstrukt für AtCRB wird in einer ähnlichen Strategie wie für AtCRU3 erläutert, erstellt. Vektor pCR2.1-3 wird mit mit XhoI (New England Biolabs) für 2 Stunden inkubiert und dephosphoryliert (alkalische Phosphatase, New England Biolabs). Vektor pCR2.1-4 wird ebenfalls mit XhoI in derselben Weise inkubiert und 10 die Gelfragmente per Gelelektrophorese aufgetrennt. Die entsprechenden Fragmente werden in der unter AtCRU3 beschriebenen Art und Weise aufgereinigt und ligiert, resultierend nach Bakterientransformation in dem Vektor pCR2.1-AtCRB Exon/Intron. Dieser Vektor wird für 2 Stunden mit XbaI (NEB), anschliessend für 15 min mit Klenow-Fragment (NEB), dann für 2 Stunden mit SalI inkubiert und zuletzt 15 min mit alkalischer Phosphatase (NEB) behandelt. Parallel wird der Vektor pCR2.1-3 mit BamHI (NEB), dann 15 15 min mit Klenow-Fragment und anschliessend 2 Stunden mit XhoI (NEB) inkubiert. Das Exon-Fragment von AtCRB wird nach Gelelektrophorese isoliert, gereinigt und zur Ligation eingesetzt. Beide 20 Fragmente wurden dann ligiert und der Vektor pCR2.1-AtCRB-RNAi resultierte. Der erhaltene Vektor wird pCR2.1-AtCRB-RNAi genannt. Die für die dsRNA kodierende Nukleinsäuresequenz ist durch SEQ ID NO: 107 beschrieben.

25 c) Ausgangsvektor pCR2.1-At2S3-RNAi.

Mit nachfolgendem Oligonukleotid-Primerpaar wird ein Exonbereich des 2S Speicherprotein At2S3 (SEQ ID NO: 3 bzw. 4; Basenpaar 212 bis 706 der Sequenz mit der GenBank Acc.-No: M22035) amplifiziert:

ONP9 (SEQ ID NO: 142):

5'-ATAAGAATGCGGCCGCGGATCCATGGCTAACAAAGCTTCCCTCGTC-3'

35 ONP10 (SEQ ID NO: 143):
5'-ATAAGAATGCGGCCGCGGATCCCTAGTAGTAAGGAGGGAAGAAAG-3'

Das PCR-Produkt wird in den pCR2.1-TOPO Vektor (Invitrogen) gemäss Herstellerangaben kloniert, resultierend in dem pCR2.1-5 40 Vektor und die Sequenz überprüft. Für den als Linker fungierenden Bereich wird das gleiche Intron wie unter b) mit den Primern OPN 7 und OPN 8 amplifiziert eingesetzt.

45 Das Konstrukt für At2S3 wird in einer ähnlichen Strategie wie für AtCRU3 erläutert, erstellt. Vektor pCR2.1-5 wird mit mit XhoI (New England Biolabs) für 2 Stunden inkubiert und dephosphoryliert (alkalische Phosphatase, New England Biolabs). Vektor

pCR2.1-3 werden ebenfalls mit XhoI in derselben Weise inkubiert und die Gelfragmente per Gelelektrophorese aufgetrennt. Die entsprechenden Fragmente werden in der unter AtCRU3 beschriebenen Art und Weise aufgereinigt und ligiert, resultierend nach Bakterientransformation in dem Vektor pCR2.1-At2S3 Exon/Intron. Dieser Vektor wird für 2 Stunden mit SalI (NEB), anschliessend für 15 min mit Klenow-Fragment (NEB) inkubiert und zuletzt 15 min mit alkalischer Phosphatase (NEB) behandelt. Parallel wird der Vektor pCR2.1-5 mit BamHI (NEB) und dann 15 min mit Klenow-Fragment inkubiert. Das Exon-Fragment von At2S3 wird nach Gelelektrophorese isoliert, gereinigt und zur Ligation eingesetzt. Beide Fragmente werden dann ligiert und der Vektor pCR2.1-At2S3-RNAi resultierte. Die für die dsRNA kodierende Nukleinsäuresequenz ist durch SEQ ID NO: 109 beschrieben.

15

d) Herstellung von Super-Suppressionskonstrukt 1

Die Vektoren pCR2.1-AtCRU3-RNAi und pCR2.1-4 (siehe oben) werden mit den Restriktionsenzymen XhoI und SalI für 2 Stunden bei 37°C inkubiert, die DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und sowohl der Vektor als auch das PCR-Insert aus pCR2.1-4 ausgeschnitten und mit dem "Gelpurification"-Kit von Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt und mit 50 µL Elutionspuffer eluiert. Vom Vektor wird 1 µL, vom PCR-Insert aus pCR2.1-4 8 µL der Eluate für die Ligation eingesetzt, resultierend in dem Konstrukt pCR2.1-sRNAi1. Dieser Vektor wird für 2 Stunden mit dem Restriktionsenzym XhoI und dann für 15 min mit Klenow-Fragment inkubiert.

30 Der Vektor pCR2.1-AtCRB-RNAi (siehe oben) wird mit dem Enzym EcoRI für 2 Stunden inkubiert und ebenfalls 15 min mit Klenow-Fragment behandelt. Beide Inkubationsansätze werden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und jeweils der Vektor (pCR2.1-sRNAi1) bzw. das Insert (aus pCR2.1-AtCRB-RNAi) aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA-Fragmente wie oben beschrieben aufgereinigt. Für die Ligation werden 1 µL des Eluates vom Vektor und 8 µL des Eluates vom Insert eingesetzt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Das resultierende Konstrukt wird mit pCR2.1-sRNAi2 bezeichnet. Der resultierende Vektor wird mit dem Enzym XbaI und anschliessend mit Klenow-Fragment inkubiert. Der Vektor pCR2.1-4 wird mit den Enzymen EcoRV und XbaI und anschliessend mit Klenow-Fragment inkubiert. Nach Gelelektrophorese und -reinigung wird das Fragment aus pCR2.1-4 mit dem Vektor pCR2.1-sRNAi2 ligiert, resultierend in dem Konstrukt pCR2.1-sRNAi3. Der resultierende Vektor wird dann mit dem Enzym ApaI für 2 Stunden und dann mit Klenow-Fragment für 15 min inkubiert. Als Insert wird der Vektor pCR2.1-At2S3-RNAi mit dem Enzym EcoRI für 2 Stunden und dann mit

Klenow-Fragment für 15 min inkubiert. Nach Gelelektrophorese und -reinigung werden die Eluate ligiert, resultierend in dem Vektor pCR2.1-sRNAi4. Aus diesem Vektor wird dann das sRNAi4-Fragment (SEQ ID NO: 144; vgl. Fig. 1(1)), kodierend für die super-suppressierende dsRNA, durch Inkubation mit HindIII und PvuI ausgeschnitten und in den binären Vektor pSUN-USP (SEQ ID NO: 179) ligiert. Das Konstrukt dient der gleichzeitigen Suppression von *Arabidopsis thaliana* Speicherproteinen CRB (SEQ ID NO: 4), CRU3 (SEQ ID NO: 112) und At2S3 (SEQ ID NO: 118).

10

Der verwendete Vektor pSUN-USP ist ein binärer Vektor zur Pflanzentransformation auf Basis von pBinAR (Höfgen und Willmitzer (1990) Plant Science 66: 221-230). Eine gewebespezifische Expression im Samen lässt sich unter Verwendung des gewebespezifischen 15 Promotors USP-Promotors erzielt.

e) Herstellung von Super-Suppressionskonstrukt 2

Ausgehend von *Arabidopsis thaliana* cDNA wird ein Fragment aus dem 20 Speicherprotein AtCRU3 (SEQ ID NO: 111, 112) mit dem nachfolgenden Oligonukleotid-Primerpaar unter den in Beispiel 2 angegebenen PCR-Bedingungen amplifiziert:

OPN 11: 5'-AAAAGGCCTGTGTCCATTTGGCCGGAAACAAC-3' (SEQ ID NO: 148)

25 OPN 12: 5'-AAAGATATCACCCCTGGAGAACGCCACGAGTG-3' (SEQ ID NO: 149).

Das erhaltene Fragment wird in den Vektor pCR2.1-TOPO Vektor (In-vitrogen) gemäss Herstellerangaben kloniert, resultierend in den pCR2.1-6 und die Sequenzen überprüft.

30

Ausgehend von *Arabidopsis thaliana* cDNA wird ein Fargment aus dem Speicherprotein At2S3 (SEQ ID NO: 3, 4) mit dem nachfolgenden Oligonukleotid-Primerpaar unter den in Beispiel 2 angegebenen PCR-Bedingungen amplifiziert:

35

OPN 13: 5'-AAAAGGCCTATGGCTAACAAAGCTTCCCTCGTC-3' (SEQ ID NO: 150)

OPN 14: 5'-AAAGATATCCTAGTAGTAAGGAGGAAAGAAAG-3' (SEQ ID NO: 151).

Das erhaltene Fragment wird in den Vektor pCR2.1-TOPO Vektor (In-vitrogen) gemäss Herstellerangaben kloniert, resultierend in den pCR2.1-7 und die Sequenzen überprüft.

Aus den pCR2.1-3, pCR2.1-4 (siehe Beispiel 2) und pCR2.1-6 und pCR2.1-7 werden dann die Konstrukte folgendermassen zusammen ligiert: Der Vektor pCR2.1-3 wird 2 Stunden mit EcoRV inkubiert und anschliessend 15 min mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Der Vektor pCR2.1-6 wird mit den Enzymen StuI und EcoRV

für 2 Stunden inkubiert und das PCR-Insert über Gelelektrophorese und -reinigung isoliert. Vektor pCR2.1-3 und Insert aus pCR2.1-6 werden dann über Nacht bei 4°C ligiert, resultierend in dem Konstrukt pCR2.1-sRNAi5. Dieser Vektor wird dann mit EcoRV inkubiert und dephosphoryliert und mit dem StuI/ EcoRV inkubierten und gelaufgereinigten Fragment aus pCR2.1-7 ligiert, resultierend in dem Konstrukt pCR2.1-sRNAi6. Dieser Vektor wird dann mit XhoI inkubiert und dephosphoryliert. Der Vektor pCR2.1-4 wird mit SalI und XhoI inkubiert und das Insert aus pCR2.1-4 mit dem vorbereitet 5 Vektor pCR2.1-sRNAi6 ligiert, resultierend in dem Konstrukt pCR2.1-sRNAi7. Ausgehend von pCR2.1-sRNAi7 wird eine PCR mit den nachfolgenden Primerpaar unter den in Beispiel 2 gegebenen Bedingungen durchgeführt:

15 OPN 15: 5' CCGCTCGAGCTCAGGGTCTTTCTTGCCCACT (SEQ ID NO: 152)
OPN 16: 5'-CCGGTCGACCTAGTAGTAAGGAGGGAAGAAAG (SEQ ID NO: 153).

Das resultierende PCR-Produkt wird mit den Enzymen XhoI und SalI inkubiert. Das Fragment wird dann in den Vektor pCR2.1-sRNAi7 20 (inkubiert mit XhoI) ligiert, resultierend in dem Konstrukt pCR2.1-sRNAi8. Aus diesem Vektor wird dann das sRNAi8-Fragment (SEQ ID NO: 146; vgl. Fig. 1(2)), kodierend für die super-supprimierende dsRNA, durch Inkubation mit HindIII und XbaI ausgeschnitten und in den binären Vektor pSUN-USP (SEQ ID NO: 179) 25 ligiert. Das Konstrukt dient der gleichzeitigen Suppression von *Arabidopsis thaliana* Speicherproteinen CRB (SEQ ID NO: 4), CRU3 (SEQ ID NO: 112) und At2S3 (SEQ ID NO: 118).

Beispiel 3: Transformation von Agrobacterium
30

Die Agrobacterium-vermittelte Pflanzentransformation kann zum Beispiel unter Verwendung der *Agrobacterium tumefaciens*-Stämme GV3101 (pMP90) (Koncz und Schell (1986) Mol Gen Genet 204: 383-396) oder LBA4404 (Clontech) durchgeführt werden. Die Transformation kann durch Standard-Transformationstechniken durchgeführt werden (Deblaere et al. (1984) Nucl Acids Res 13:4777-4788).

Beispiel 4: Pflanzentransformation

40 Die Agrobacterium-vermittelte Pflanzentransformation kann unter Verwendung von Standard-Transformations- und Regenerationstechniken durchgeführt werden (Gelvin, Stanton B., Schilperoort, Robert A., Plant Molecular Biology Manual, 2. Aufl., Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1995, in Sect., Ringbuc Zentrale Signatur: BT11-P
45 ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R., Thompson, John E., Methods

in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton: CRC Press, 1993, 360 S., ISBN 0-8493-5164-2).

Die Transformation mittels Agrobacterium von *Arabisopsis thaliana* wird durch die Methode nach Bechthold et al., 1993 (C.R. Acad. Sci. Ser. III Sci. Vie., 316, 1194-1199) durchgeführt. Beispielsweise kann Raps mittels Kotyledonen- oder Hypokotyltransformation transformiert werden (Moloney et al., Plant Cell Report 8 (1989) 238-242; De Block et al., Plant Physiol. 91 10 (1989) 694-701). Die Verwendung von Antibiotika für die Agrobacterium- und Pflanzenselektion hängt von dem für die Transformation verwendeten binären Vektor und Agrobacterium-Stamm ab. Die Rapsselektion wird gewöhnlich unter Verwendung von Kanamycin als selektierbarem Pflanzenmarker durchgeführt.

15 Der Agrobacterium-vermittelte Gentransfer in Lein (*Linum usitatissimum*) lässt sich unter Verwendung von beispielsweise einer von Mlynarova et al. (1994) Plant Cell Report 13:282-285 beschriebenen Technik durchführen.

20 Die Transformation von Soja kann unter Verwendung von beispielsweise einer in EP-A-0 0424 047 (Pioneer Hi-Bred International) oder in EP-A-0 0397 687, US 5,376,543, US 5,169,770 (University Toledo) beschriebenen Technik durchgeführt werden.

25 Die Pflanzentransformation unter Verwendung von Teilchenbeschuß, Polyethylenglycol-vermittelter DNA-Aufnahme oder über die Siliziumcarbonatfaser-Technik ist beispielsweise beschrieben von Freeling und Walbot "The maize handbook" (1993) ISBN 30 3-540-97826-7, Springer Verlag New York).

Beispiel 5: Untersuchung der Expression eines rekombinanten Genproduktes in einem transformierten Organismus

35 Die Aktivität eines rekombinanten Genproduktes im transformierten Wirtsorganismus wurde auf der Transkriptions- und/oder der Translationsebene gemessen.

Ein geeignetes Verfahren zur Bestimmung der Menge an Transkription des Gens (ein Hinweis auf die Menge an RNA, die für die Translation des Genproduktes zur Verfügung steht) ist die Durchführung eines Northern-Blots wie unten ausgeführt (als Bezugsstelle siehe Ausubel et al. (1988) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley: New York, oder den oben erwähnten Beispielteil), 40 wobei ein Primer, der so gestaltet ist, daß er an das Gen von Interesse bindet, mit einer nachweisbaren Markierung (gewöhnlich radioaktiv oder chemilumineszent) markiert wird, so daß, wenn die 45

Gesamt-RNA einer Kultur des Organismus extrahiert, auf einem Gel aufgetrennt, auf eine stabile Matrix transferiert und mit dieser Sonde inkubiert wird, die Bindung und das Ausmaß der Bindung der Sonde das Vorliegen und auch die Menge der mRNA für dieses Gen 5 anzeigt. Diese Information zeigt den Grad der Transkription des transformierten Gens an. Zelluläre Gesamt-RNA kann aus Zellen, Geweben oder Organen mit mehreren Verfahren, die alle im Fachgebiet bekannt sind, wie zum Beispiel das von Bormann, E.R., et al. (1992) Mol. Microbiol. 6:317-326 beschriebene, präpariert werden.

10

Northern-Hybridisierung:

Für die RNA-Hybridisierung wurden 20 µg Gesamt-RNA oder 1 µg poly(A)⁺-RNA mittels Gelelektrophorese in Agarosegelen mit einer Stärke von 1,25 % unter Verwendung von Formaldehyd, wie be- 15 schrieben in Amasino (1986, Anal. Biochem. 152, 304) aufgetrennt, mittels Kapillaranziehung unter Verwendung von 10 x SSC auf positi- tiv geladene Nylonmembranen (Hybond N+, Amersham, Braunschweig) übertragen, mittels UV-Licht immobilisiert und 3 Stunden bei 68°C unter Verwendung von Hybridisierungspuffer (10 % Dextranulfat 20 Gew./Vol., 1 M NaCl, 1 % SDS, 100 mg Heringssperma-DNA) vorhybridisiert. Die Markierung der DNA-Sonde mit dem Highprime DNA labeling-Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) erfolgte während der Vorhybridisierung unter Verwendung von alpha-³²P-dCTP (Amersham Pharmacia, Braunschweig, Deutschland). Die Hybridisierung wurde nach 25 Zugabe der markierten DNA-Sonde im gleichen Puffer bei 68°C über Nacht durchgeführt. Die Waschschritte wurden zweimal für 15 min unter Verwendung von 2 X SSC und zweimal für 30 min unter Verwen- dung von 1 X SSC, 1 % SDS, bei 68°C durchgeführt. Die Exposition der verschlossenen Filter wurde bei -70°C für einen Zeitraum von 1 30 bis 14 T durchgeführt.

Zur Untersuchung des Vorliegens oder der relativen Menge an von dieser mRNA translatiertem Protein können Standardtechniken, wie ein Western-Blot, eingesetzt werden (siehe beispielsweise Ausubel 35 et al. (1988) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley: New York). Bei diesem Verfahren werden die zellulären Gesamt-Proteine extrahiert, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Matrix, wie Nitrozellulose, übertragen und mit einer Sonde, wie einem Antikörper, der spezifisch an das gewünschte Protein bin- 40 det, inkubiert. Diese Sonde ist gewöhnlich mit einer chemilumi- neszenten oder kolorimetrischen Markierung versehen, die sich leicht nachweisen lässt. Das Vorliegen und die Menge der beobach- teten Markierung zeigt das Vorliegen und die Menge des gewünsch- ten, in der Zelle vorliegenden mutierten Proteins an.

Beispiel 6: Analyse der Auswirkung der rekombinanten Proteine auf die Produktion des gewünschten Produktes

Die Auswirkung der genetischen Modifikation in Pflanzen, Pilzen, 5 Algen, Ciliaten oder auf die Produktion einer gewünschten Verbindung (wie einer Fettsäure) kann bestimmt werden, indem die modifizierten Mikroorganismen oder die modifizierte Pflanze unter geeigneten Bedingungen (wie den vorstehend beschriebenen) gezüchtet werden und das Medium und/oder die zellulären Komponenten auf die 10 erhöhte Produktion des gewünschten Produktes (d.h. von Lipiden oder einer Fettsäure) untersucht wird. Diese Analysetechniken sind dem Fachmann bekannt und umfassen Spektroskopie, Dünnschichtchromatographie, Färbeverfahren verschiedener Art, enzymatische und mikrobiologische Verfahren sowie analytische Chromatographie, wie Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (siehe beispielsweise Ullman, Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 89-90 und S. 443-613, VCH: Weinheim (1985); Fallon, A., et al., (1987) "Applications of HPLC in Biochemistry" in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17; Rehm et 15 al. (1993) Biotechnology, Bd. 3, Kapitel III: "Product recovery and purification", S. 469-714, VCH: Weinheim; Belter, P.A., et al. (1988) Bioseparations: downstream processing for Biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy, J.F., und Cabral, J.M.S. (1992) Recovery processes for biological Materials, John Wiley 20 and Sons; Shaeiwitz, J.A., und Henry, J.D. (1988) Biochemical Separations, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. B3; Kapitel 11, S. 1-27, VCH: Weinheim; und Dechow, F.J. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, 25 Noyes Publications).

30

Neben den oben erwähnten Verfahren werden Pflanzenlipide aus Pflanzenmaterial wie von Cahoon et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (22):12935-12940, und Browne et al. (1986) Analytic Biochemistry 152:141-145, beschrieben extrahiert. Die qualitative 35 und quantitative Lipid- oder Fettsäureanalyse ist beschrieben bei Christie, William W., Advances in Lipid Methodology, Ayr/Scotland: Oily Press (Oily Press Lipid Library; 2); Christie, William W., Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide - Ayr, Scotland: Oily Press, 1989, Repr. 1992, IX, 307 S. (Oily 40 Press Lipid Library; 1); "Progress in Lipid Research, Oxford: Pergamon Press, 1 (1952) - 16 (1977) u.d.T.: Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN.

Zusätzlich zur Messung des Endproduktes der Fermentation ist 45 es auch möglich, andere Komponenten der Stoffwechselwege zu analysieren, die zur Produktion der gewünschten Verbindung verwendet werden, wie Zwischen- und Nebenprodukte, um die Gesamteffizienz

der Produktion der Verbindung zu bestimmen. Die Analyseverfahren umfassen Messungen der Nährstoffmengen im Medium (z.B. Zucker, Kohlenwasserstoffe, Stickstoffquellen, Phosphat und andere Ionen), Messungen der Biomassezusammensetzung und des Wachstums, 5 Analyse der Produktion üblicher Metabolite von Biosynthesewegen und Messungen von Gasen, die während der Fermentation erzeugt werden. Standardverfahren für diese Messungen sind in Applied Microbial Physiology; A Practical Approach, P.M. Rhodes und P.F. Stanbury, Hrsgb., IRL Press, S. 103-129; 131-163 und 165-192 10 (ISBN: 0199635773) und darin angegebenen Literaturstellen beschrieben.

Ein Beispiel ist die Analyse von Fettsäuren (Abkürzungen: FAME, Fettsäuremethylester; GC-MS, Gas-Flüssigkeitschromatographie-Masspektrometrie; TAG, Triacylglycerin; TLC, Dünnschichtchromatographie). 15

Der unzweideutige Nachweis für das Vorliegen von Fettsäureprodukten kann mittels Analyse rekombinanter Organismen nach Standard- 20 Analyseverfahren erhalten werden: GC, GC-MS oder TLC, wie verschiedentlich beschrieben von Christie und den Literaturstellen darin (1997, in: Advances on Lipid Methodology, Vierte Aufl.: Christie, Oily Press, Dundee, 119-169; 1998, Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Verfahren, Lipide 33:343-353).

25 Das zu analysierende Material kann durch Ultraschallbehandlung, Mahlen in der Glasmühle, flüssigen Stickstoff und Mahlen oder über andere anwendbare Verfahren aufgebrochen werden. Das Material muss nach dem Aufbrechen zentrifugiert werden. Das Sediment 30 wird in Aqua dest. resuspendiert, 10 min bei 100°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und erneut zentrifugiert, gefolgt von Extraktion in 0,5 M Schwefelsäure in Methanol mit 2 % Dimethoxypropan für 1 Std. bei 90°C, was zu hydrolysierten Öl- und Lipidverbindungen führt, die transmethylierte Lipide ergeben. Diese Fettsäuremethylester werden in Petrolether extrahiert und schließlich einer GC-Analyse unter Verwendung einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 mikrom, 0,32 mm) bei einem Temperaturgradienten zwischen 170°C und 240°C für 20 min und 5 min bei 240°C unterworfen. Die Identität der erhaltenen Fettsäuremethylester muss unter Verwendung von Standards, die aus kommerziellen Quellen erhältlich sind (d.h. Sigma), definiert werden. 35 40

Für die Öl-Analyse der mit den Suppressionskonstrukten transformierten *Arabidopsis* Pflanzen wird folgendes Protokoll angewendet:

76

Die Extraktion der Lipide aus Samen wird nach der Methode von Bligh & Dyer (1959) Can J Biochem Physiol 37:911 durchgeführt. Dazu werden 5 mg Arabidopsis Samen in 1,2 ml Qiagen-Microtubes (Qiagen, Hilden) auf einer Sartorius (Göttingen) Mikrowaage abge-
5 wogen. Das Samenmaterial wird mit 500 μ L Chloroform/Methanol (2:1; enthält Mono-C17-glycerin von Sigma als internen Standard) in der Rätschmühle MM300 der Firma Retsch (Haan) homogenisiert und 20 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 500 μ L 50 mM Kalium-phosphatpuffer pH 7,5 erfolgt die Phasentrennung. Von der organi-
10 schen Phase werden 50 μ L abgenommen, mit 1500 μ L Chloroform verdünnt und 5 μ L auf die Kapillaren Chromarods SIII der Firma Ia-
troscan (SKS, Bechenheim) aufgetragen. Nach Auftrag der Proben werden diese für 15 min in einer Dünnschichtkammer, die gesättigt ist mit 6:2:2 Chloroform: Methanol: Toluol in einem ersten
15 Schritt aufgetrennt. Nach Ablauf der Zeit werden die Kapillaren 4 min bei Raumtemperatur getrocknet und dann für 22 min in eine Dünnschichtkammer, die gesättigt ist mit 7:3 n-Hexan:Dieethyle-
ther gestellt. Nach einem weiteren Trocknungsschritt für 4 min bei Raumtemperatur werden die Proben in einem Iatroskan MK-5
20 (SKS, Bechenheim) entsprechend Fraser & Taggart, 1988 J. Chroma-
togr. 439:404 analysiert. Folgende Parameter wurden für die Mes-
sungen eingestellt: Slice width 50 msec, Treshold 20 mV, Noise 30, Skim ratio 0. Die Quantifizierung der Daten erfolgte anhand des internen Standards Mono-C17-glycerin (Sigma) sowie einer er-
25 stellten Eichkurve mit Tri-C17-glycerin (Sigma) mittels des Pro-
gramms ChromStar (SKS, Beichenheim).

Für die quantitative Bestimmung der Ölgehalte werden Samen von jeweils 10 Pflanzen derselben unabhängigen transgenen Linie ana-
30 lysiert. Insgesamt wurde der Ölgehalt von 30 transgene Linien der T1 Generation, 10 transgene Linien mit je 10 Pflanzen der T2 Ge-
neration und 5 transgene Linien mit je 10 Pflanzen der T3 Linien bestimmt. Dabei zeigen die transgenen Pflanzen einen signifikant höheren Ölgehalt als entsprechend gleichbehandelte Kontrollpflan-
35 zen.

Beispiel 7:

Zum Nachweis der Funktionalität der multiplen RNAi Konstrukte
40 wurden Gene ausgewählt, deren Supression einen deutlichen phäno-
logischen Effekt hervorrufen. Ein solches Gen ist zum Beispiel Toc159. Dieses Gen ist essentiell für die Entwicklung und Funk-
tionalität von Chloroplasten in Arabidopsis (Bauer et al. *Nature*, 403, 203-207). Ein Ausschalten dieses Gens führt zu chlorophyll-
45 defizienten Pflanzen, deren Blatt-Erscheinungsbild dann hell-grün bis weiss ist. Dieser Albino-Phänotyp ist sehr leicht zu unterscheiden von normalen Pflanzen.

Als weiteres visuelles Reprotergen wurde GFP, das grün-fluoreszierende Protein aus der Qualle *Aequorea victoria* eingesetzt.

Dieses Reportergen ist ein häufig verwendetes Reportergen in Pflanzen (siehe z.B. Stewart, Plant Cell Rep 2001 20(5):376-82).

5 Ausgehend von *Arabidopsis thaliana* cDNA oder vom Plasmid pEGFP (BD Clontech, Heidelberg, Genbank-Eintrag U476561) wurde über PCR mittels der aufgeführten Oligonukleotide erzeugt. Dabei wurde folgendes Protokoll eingesetzt:

10 Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

5,00 µL Template cDNA oder genomische DNA (ca. 1 µg)
5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25 mM MgCl₂
5,00 µL 2mM dNTP

15 1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)
0,50 µL Advantage-Polymerase (Clontech)

PCR-Programm: Anfangsdenaturierung für 2 min bei 95°C, dann 35 Zyklen mit 45 sec 95°C, 45 sec 55°C und 2 min 72°C. Abschliessende

20 Extension von 5 min bei 72°C.

a) Ausgangsvektor pGEM-Toc159: Ausgehend von *Arabidopsis* cDNA wurde mit nachfolgendem Oligonukleotid-Primerpaar ein Fragment aus Toc159 (Genbank Acc.-No. **T14P8.24**) amplifiziert:

25

ONP18 (SEQ ID NO: 123):

5'-CTCGAGGAATTCATGGACTCAAAGTCGGTTACTCCA

ONP19 (SEQ ID NO: 124):

30 5'-GGATCCATAAGCAAGCTTTCTACTCTCCCCATCTGTGGA

Das PCR Produkt wurde in den Vektor pGEM-T easy von Promega (Mannheim) gemäss Herstellerangaben kloniert, resultierend in dem pGEM-Toc159 Vektor und die Sequenz überprüft.

35

b) Ausgangsvektor pGEM-GFP: Ausgehend von dem Plasmid pEGFP (BD Clontech, Heidelberg, GenbankAcc.-No.: U476561) wurde mit nachfolgendem Oligonukleotid-Primerpaar ein Fragment aus GFP amplifiziert:

40

ONP20 (SEQ ID NO: 125): 5'-AAGCTTCCAACACTTGTCACTACTTT

ONP21 (SEQ ID NO: 126): 5'-GGATCCTTAAAGCTCATCATGTTTGT

Das PCR Produkt wurde in den Vektor pGEM-T easy von Promega

45 (Mannheim) gemäss Herstellerangaben kloniert, resultierend in dem pGEM-GFP Vektor und die Sequenz überprüft.

c) Herstellung des Konstruktes pGEM-159-GFP Der Vektor pGEM-GFP wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII und BamHI für 2 Stunden inkubiert. Parallel wurde der Vektor pGEM-Toc159 mit den gleichen Restriktionsenzymen inkubiert, anschliessend dann zusätzlich für 5 15 min mit alkalischer Phosphatase behandelt. Die alkalische Phosphatase wurde anschliessend durch Erhitzen auf 95 °C für 10 min inaktiviert. Die entstandenen DNA-Fragmente aus beiden Ansätzen wurden über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das 558 bp Fragment aus pGEM-GFP sowie das 3471 bp Fragment von pGEM-Toc159 10 wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem „Gelpurification“-Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Beide Fragmente wurden für 2 h bei 16°C ligiert (T4 Ligase, New England Biolabs) und anschliessend nach Herstellerangaben in *E. coli* DH5 α Zellen (Stratagen) transformiert. Positive Klone wurden durch PCR 15 mit dem Primerpaar OPN1 und OPN4 identifiziert und anschliessend verifiziert durch Sequenzierung. Der erhaltene Vektor wurde mit pGEM-159-GFP bezeichnet.

d) Herstellung des Suppressionskonstruktes 1: Der Vektor 20 pGEM-159-GFP wurde einerseits mit den Restriktionsenzymen XhoI und BamHI, ein weiterer Ansatz mit BamHI und SalI inkubiert. Der zweite Ansatz mit BamHI/ SalI wurde anschliessend für weitere 15 min mit alkalischer Phosphatase inkubiert. Die DNA-Fragmente aus beiden Ansätzen wurden über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt 25 und folgende Fragmente ausgeschnitten: Ansatz BamHI-XhoI das 1091 bp Fragment; Ansatz BamHI-SalI das 4029 bp Fragment. Beide Fragmente wurden nach Aufreinigung aus dem Agarose-Gel (siehe oben) für 2 h bei 16°C mit T4 Ligase inkubiert und anschliessend in *E. coli* DH5 α Zellen (Stratagen) transformiert. Positive Klone wurden 30 durch PCR mit dem Primerpaar OPN1 identifiziert und anschliessend verifiziert durch Sequenzierung. Der erhaltene Vektor wurde als Suppressionskonstrukt 1 bezeichnet.

e) Herstellung des Suppressionskonstruktes 2: Das Suppressionskonstrukt 1 und der Vektor p3300.1 (Andreas Hilbrunner, Dissertation 35 ETH Zürich, 2003) wurden für 2h Stunden mit dem Restriktionsenzym EcoRI inkubiert. Anschliessend wurde der Vektor p3300.1 15 min mit alkalischer Phosphatase behandelt. Beide Ansätze wurden gemischt und für 2 h bei 16°C mit T4 Ligase inkubiert. Der Ligationsansatz wurde dann in *E. coli* DH5 α Zellen (Stratagen) transformiert. Das entstandene Suppressionskonstrukt 2 wurde dann für die Agrobacterium- und Pflanzentransformation eingesetzt. Die Nukleinsäuresequenz kodierend für Suppressionskonstrukt 2 (p3300.1-Toc159-GFP-RNAi) ist unter SEQ ID NO: 122 wiedergegeben.

Die Transformation von Agrobakterien und Pflanzen wurde wie in Beispiel 3 bzw. 4 beschrieben durchgeführt. Zum Nachweis der Funktionalität des Suppressionskonstruktes 2 wurde dieses durch die nach Bechtold et al., 1993 (C.R. Acad. Sci. Ser. III Sci. 5 Vie., 316, 1194-1199) beschriebene Blüten-Transformationsmethode in *Arabidopsis* transformiert. Aus Ausgangsmaterial wurden *Arabidopsis* Pflanzen der Varietät Columbia-0 verwendet, die bereits die T-DNA des binären Vektors pBIN-35S-GFP enthielten.

10 Durch Anregung durch ultraviolette Licht im Wellenlängenbereich 470-490 nm die grüne Fluoreszenz von GFP in diesen Pflanzen angeregt werden und damit die Expression des eingebrachten Transgens überprüft werden. Dazu wurden Keimlinge 1 Woche nach Keimung oder Blattstücke bei älteren Pflanzen mit dem Fluoreszenzmikroskop 15 MZFLIII von Leica analysiert. Zur Anregung von GFP wurden folgende Parameter eingestellt: Quecksilberlampe HBO 100W/DC, Filter GFP3, Bildbearbeitung Leica-Software. Speziell die Verwendung eines Filters (GFP3), der oberhalb einer Wellenlänge von 525 nm nicht mehr durchlässig ist, ermöglicht die GFP-Analyse von grünen 20 Blattmaterial. Ohne diesen Filter könnte die starke Autofluoreszenz des Blattfarbstoffes Chlorophyll nicht ausgeschlossen werden. Die zur Transformation verwendete *Arabidopsis* Linie zeigte eine starke GFP Expression nach mikroskopischer Analyse.

25 Transformierte Samen wurden direkt auf Erde ausgelegt und angezogen. Nach einer Woche wurde nach Keimlingen gesucht, die keinen oder einen reduzierten Anteil des Blattfarbstoffes Chlorophyll enthielten. Solche Pflanzen waren leicht an ihrer hellgrünen oder weisen Erscheinungsbild zu erkennen. Diese Pflanzen wurden dann 30 weiter durch Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht und mit entsprechend parallel gewachsenen grünen Pflanzen verglichen. Fig.5A zeigt beispielhaft ein solche identifizierte Pflanze, die sich deutlich in der Farbe der Blätter von parallel gewachsenen Pflanzen unterscheidet. Dabei ist der Albino-Phänotyp (weisse Blätter) 35 auf die Wirkung des Toc159-Suppressionskonstrukts zurückzuführen. Die nicht transformierten Nachkommen der mit Agrobacterium-Suspension behandelten Pflanzen zeigen den Albino-Phänotyp nicht. Der auftretende Albino-Phänotyp ist damit ein spezifischer Effekt des eingebrachten Suppressionskonstruktes.

40 Die Fluoreszenz-mikroskopische Untersuchung der Albino-Pflanzen zeigte dann (Fig.5B), dass keine GFP-Signale in solchen Pflanzen gefunden werden konnte. Im Vergleich dazu zeigten die parallel gewachsenen grünen Pflanzen deutliche GFP Signale. Die Abwesenheit des GFP-Signals in allen identifizierten Albino-Pflanzen demonstriert die Funktionalität des Suppressionskonstruktes, denn nur die mit dem Suppressionkonstrukt transformierten Pflanzen

80

zeigten keine GFP-Signale mehr. Es konnte keine Segregation der beiden angestrebten Phänotypen beobachtet werden. Damit konnte gezeigt werden, dass durch Verwendung von nur einem Kontrollelement (Promotor) zwei funktionell völlig unterschiedliche Gene, 5 die ihrerseits durch unterschiedliche Kontrollelemente in ihrer Expression reguliert werden, ausgeschaltet werden konnten.

10

15

20

25

30

35

40

45

Patentansprüche

1. Verfahren zur Verminderung der Expression von mindestens zwei verschiedenen, endogenen Zielgenen in einer eukaryotischen Zelle oder einem eukaryotischen Organismus durch Einbringen eines zumindest teilweise doppelsträngigen Ribonukleinsäuremoleküls in besagte eukaryotische Zelle oder besagten eukaryotischen Organismus, wobei das doppelsträngige Ribonuklein-
10 säuremolekül umfasst
 - a) mindestens zwei "sense"-Ribonukleotidsequenzen, wobei jeweils mindestens eine dieser "sense"-Ribonukleotidsequenzen im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines jeden der besagten endogenen Zielgene und
 - b) "antisense"-Ribonukleotidsequenzen, die zu besagten "sense"-Ribonukleotidsequenzen unter a) im wesentlichen komplementären sind.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die transkribierten RNAs von mindestens zwei der in ihrer Expression verminderten Zielgene untereinander eine Homologie von unter 90% haben.
- 25 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die doppelsträngige RNA durch ein einziges selbstkomplementäres Ribonukleotidmolekül gebildet wird.
- 30 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei mindestens eine der ausgehend von den einzelnen "sense"-Ribonukleotidsequenzen gebildeten doppelsträngigen RNA-Strukturen eine Länge eines geradzahligen Vielfachen von 21 oder 22 Basenpaaren hat.
- 35 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Ribonukleotidmolekül zwischen mindestens einer "sense"-Ribonukleotidsequenz und der dazu im wesentlichen komplementären "antisense"-Ribonukleotidsequenz eine Ribonukleotidsequenz kodierend für ein Intron enthält.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens zwei der endogenen Zielgene ausgewählt sind aus jeweils unterschiedlichen Klassen von Speicherprotein ausgewählt aus den Speicherprotein-Klassen der 5 2S-Albumine, 7S-Globuline, 11S/12S-Globuline oder Zein-Prolamine.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei mindestens 10 eine "sense"-Ribonukleotidsequenz im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes

a) einer Speicherprotein-Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 59, 61, 15 63, 65, 67, 69, 71, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 oder 112, oder

b) eines Gens aus dem Homogentisatabbauweg gemäß SEQ ID NO: 20 115, 116, 118 oder 120, oder

c) eines Gens ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Acetyltransacylasen, Acyltransportproteinen, Fettsäuredesaturasen, Malonyltransacylasen, β -Ketoacyl-ACP-synthetasen, 3-Keto-ACP-reduktasen, Enoyl-ACP-hydrasen, Thioesterasen, Enoyl-ACP-reduktasen, ADP-Glucosepyrophosphorylasen, Phosphorylasen, Stärkesynthetasen, Q-Enzymen, Sucrose-6-phosphatsynthetasen, Sucrose-6-phosphatphosphatasen, ADP-Glucosepyrophosphorylasen, Branching-Enzymen, 25 Debranching-Enzymen, Amylasen, Chalconsynthetasen, Chalconisomerasen, Phenylalaninammonialyasen, Dehydrokaempferol(flavone)hydroxylasen, Dihydroflavonolreduktasen, Dihydroflavanol-2-hydroxylasen, Flavonoid-3'-hydroxylasen, Flavonoid-5'-hydroxylasen, Flavonoidglycosyltransferasen, Flavonoidmethyltransferasen, Flavonoidacyltransferasen, 30 Polygalacturonasen, Cellulasen, Pectinesterasen, β -(1-4)Glucanasen, β -Galactanasen, 1-Aminocyclopropan-1-carboxylatsynthetasen, Phytoendesaturasen, Cinnamoyl-CoA:NADPH-Reduktasen, Cinnamoylalkoholdehydrogenasen, Coffeinsäure-0-methyltransferasen Cinnamoylalkoholdehydogenasen, Polyphenoloxidases, Homogentisat-1,2-dioxygenasen, Maleylacetoacetatisomerasen, Fumarylacetoacetathydrolasen, N-Methyl-putrescinoxidasen, Putrescin-N-methyltransferasen, 35 7-Methylxanthine-3-methyltransferasen, 1-Methylxanthin-3-methyltransferasen und Threoninsynthasen.

40

45

8. Ribonukleinsäuremolekül, das eine zumindest teilweise doppelsträngige Struktur hat und umfasst

5 a) mindestens zwei "sense"-Ribonukleotidsequenzen, wobei jeweils mindestens eine dieser "sense"-Ribonukleotidsequenzen im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines endogenen Zielgens, wobei jedoch nicht alle "sense"-Ribonukleotidsequenzen zu dem "sense"-RNA-Transkript eines einzigen endogenen Zielgens im wesentlichen identisch sind, und

10 b) "antisense"-Ribonukleotidsequenzen, die zu besagten "sense"-Ribonukleotidsequenzen unter a) im wesentlichen komplementären sind.

15

9. Ribonukleinsäuremolekül nach Anspruch 8, wobei das Ribonukleinsäuremolekül wie in einem der Ansprüche 2 bis 7 gekennzeichnet ist.

20

10. Transgene Expressionskassette enthaltend in funktioneller Verknüpfung mit einem Promotor eine Nukleinsäuresequenz kodierend für doppelsträngiges Ribonukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 8 oder 9, wobei das Ribonukleinsäuremolekül aus einem einzigen RNA-Strang gebildet wird.

25

11. Transgenes Expressionssystem enthaltend

30 a) in funktioneller Verknüpfung mit einem Promotor eine Nukleinsäuresequenz kodierend für "sense"-Ribonukleotidsequenzen eines doppelsträngigen Ribonukleinsäuremoleküls gemäß einem der Ansprüche 8 oder 9 und

35 b) in funktioneller Verknüpfung mit einem Promotor eine Nukleinsäuresequenz kodierend für "antisense"-Ribonukleotidsequenzen eines doppelsträngigen Ribonukleinsäuremoleküls gemäß einem der Ansprüche 8 oder 9,

40 wobei das Ribonukleinsäuremolekül aus den beiden unter a) und b) definierten Strängen gebildet wird, und die Promotoren so gewählt sind, das in einem bestimmten Organismus oder Zelle die gleichzeitige Expression von "sense"-Ribonukleotidsequenzen und "antisense"-Ribonukleotidsequenzen gewährleistet ist.

45

12. Transgener Vektor enthaltend eine transgene Expressionskassette gemäß Anspruch 10 oder ein transgenes Expressionssystem gemäß Anspruch 11.
- 5 13. Transgener Organismus enthaltend eine transgene Expressionskassette gemäß Anspruch 10 oder ein transgenes Expressionssystem gemäß Anspruch 11 oder einen transgenen Vektor gemäß Anspruch 12.
- 10 14. Transgener Organismus nach Anspruch 13 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bakterien, Hefen, nicht-menschlichen Tieren und Pflanzen.
15. Transgener Organismus nach Ansprüche 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe der landwirtschaftlichen Nutzpflanzen.
16. Verwendung eines Ribonukleotidmoleküls nach einem der Ansprüche 8 oder 9, einer transgenen Expressionskassette gemäß Anspruch 10, eines transgenen Expressionssystem gemäß Anspruch 11, eines transgenen Vektors gemäß Anspruch 12 oder eines transgenen Organismus gemäß einem der Ansprüche 13 bis 15 zur Herstellung von Arzneimitteln, in biotechnologischen Verfahren oder in der Pflanzenbiotechnologie.
- 25 17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei mindestens einer der nachfolgenden Eigenschaften in Pflanzen erzielt wird:
 - a) Verbesserter Schutz gegen abiotische Stressfaktoren
 - 30 b) Modifikation der Zusammensetzung und/oder des Gehaltes an Fettsäuren, Lipiden oder Ölen
 - c) Modifikation der Kohlenhydratzusammensetzung
 - 35 d) Veränderung der Farbe oder Pigmentierung
 - e) Verminderung des Gehaltes von Speicherproteinen
 - 40 f) Erreichen einer Resistenz gegen pflanzliche Pathogene
 - g) Verhinderung von Halmbruch
 - h) Verzögerung der Fruchtreifung
 - 45 i) Erzielen einer männlichen Sterilität

85

- j) Verminderung unerwünschter oder toxischer Pflanzeninhaltsstoffe
- 5 k) Verzögerung von Alterserscheinungen
- l) Modifikation der Lignifikation und/oder des Ligningehaltes
- 10 m) Modifikation des Faseranteils in Nahrungsmitteln oder der Faserqualität in Baumwolle
- n) Verminderung der Stoßanfälligkeit
- 15 o) Steigerung der Vitamin E Biosynthese
- p) Verminderung des Nikotingehaltes, des Coffeingehaltes oder des Theophyllin-Gehaltes
- 20 q) Erhöhung des Methioningehaltes durch Verminderung der Threoninbiosynthese

25

30

35

40

45

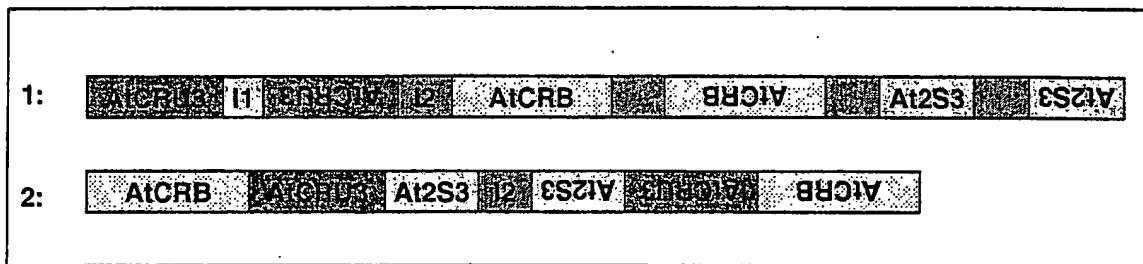


Fig. 1

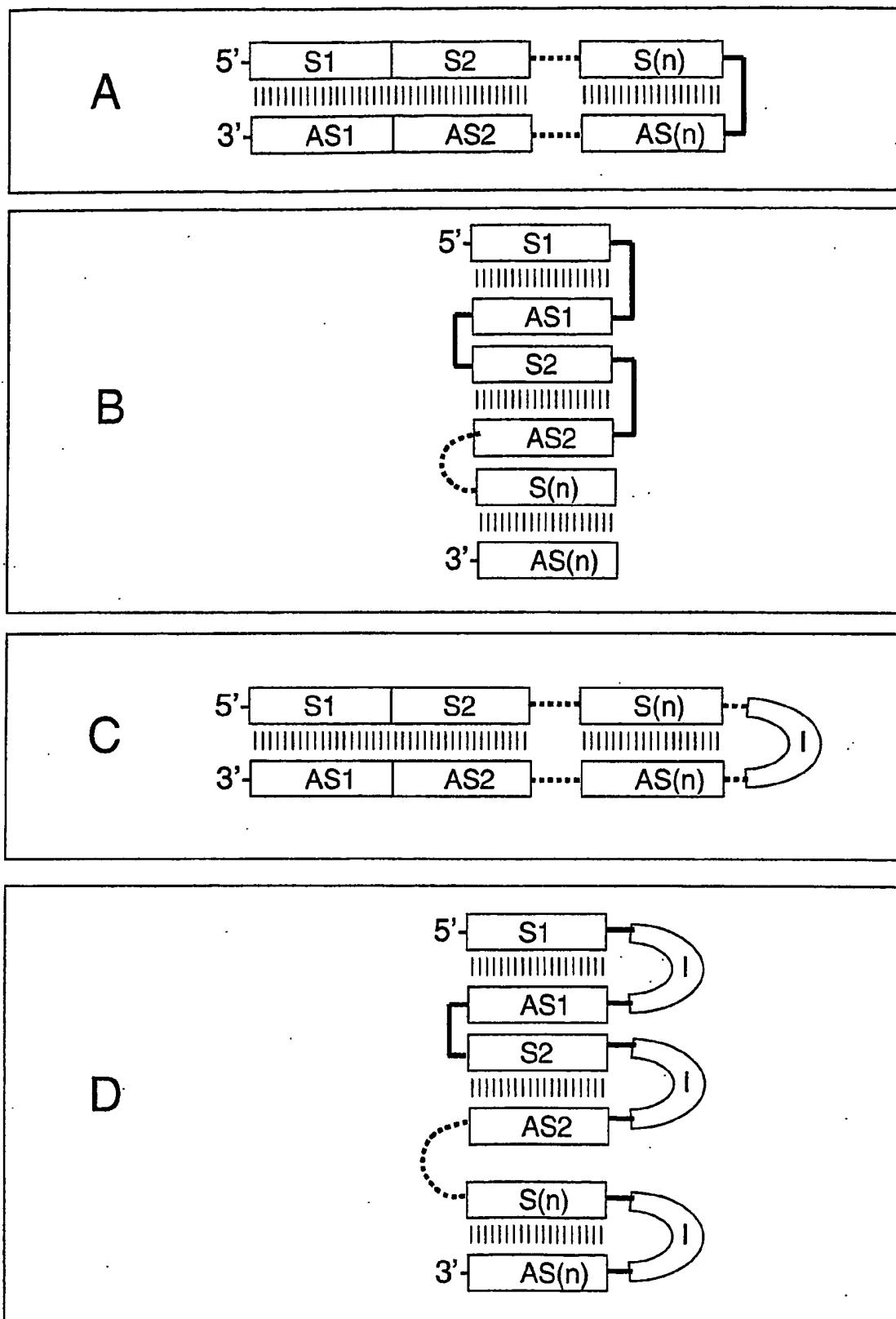


Fig.2

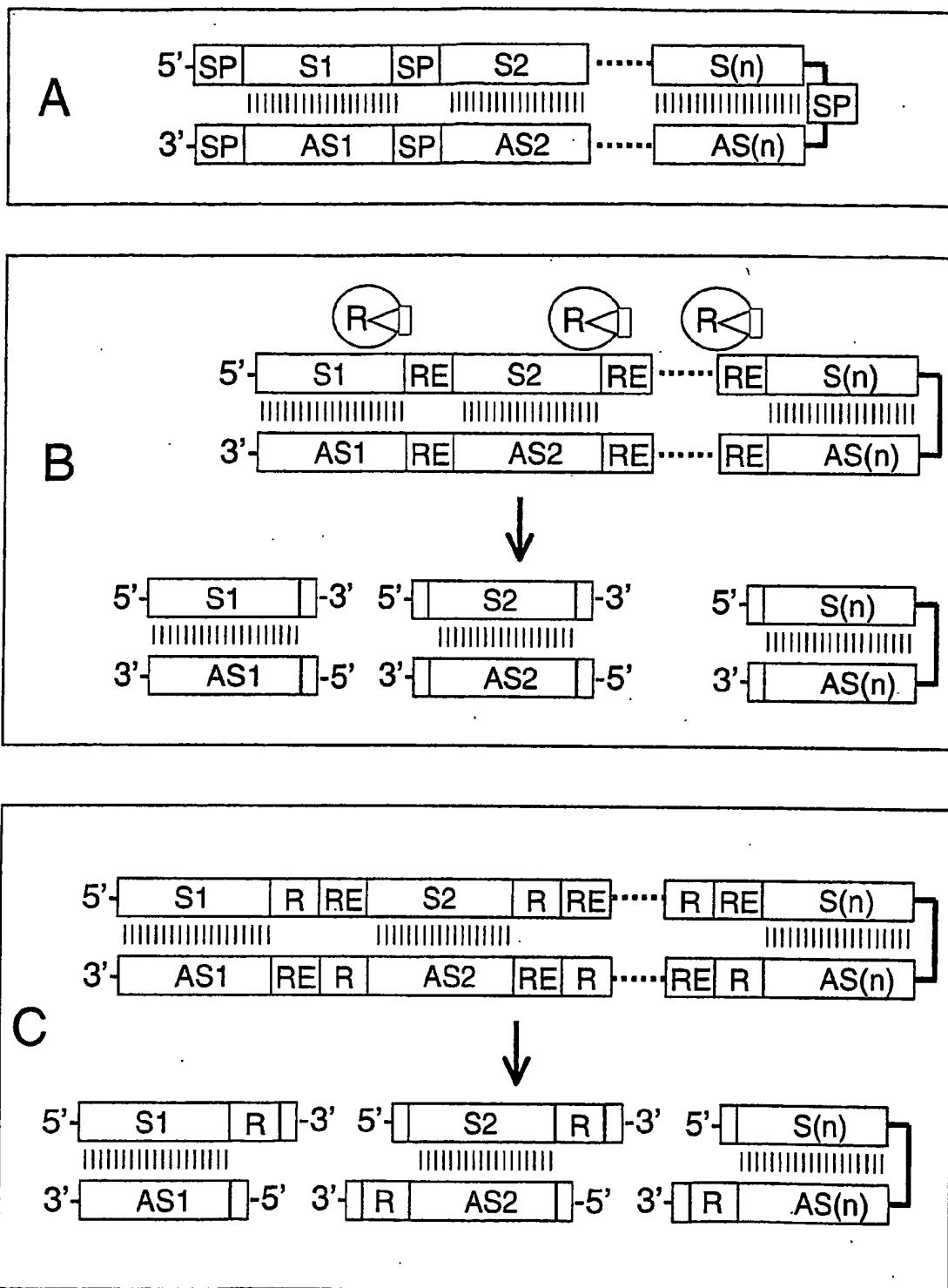


Fig.3

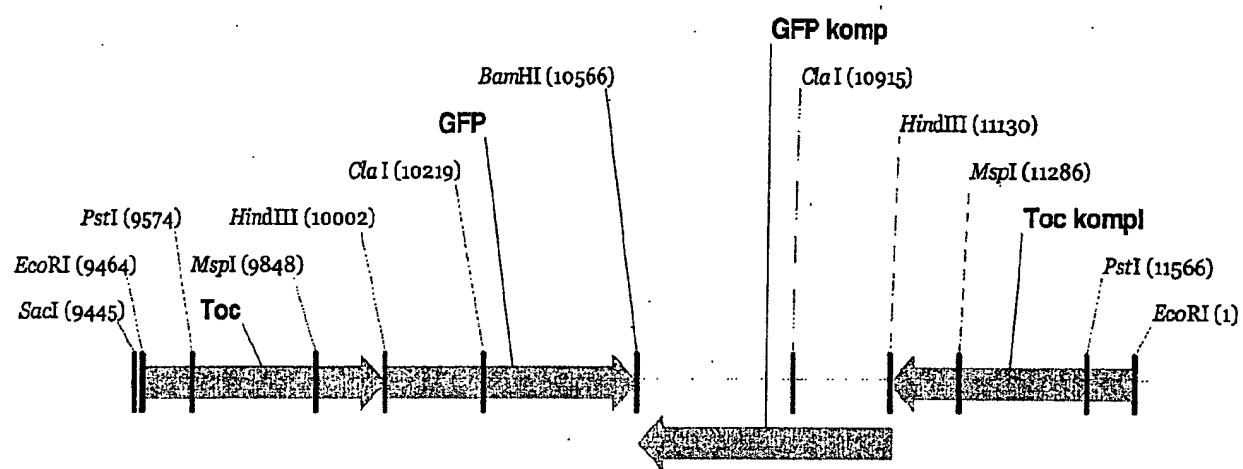
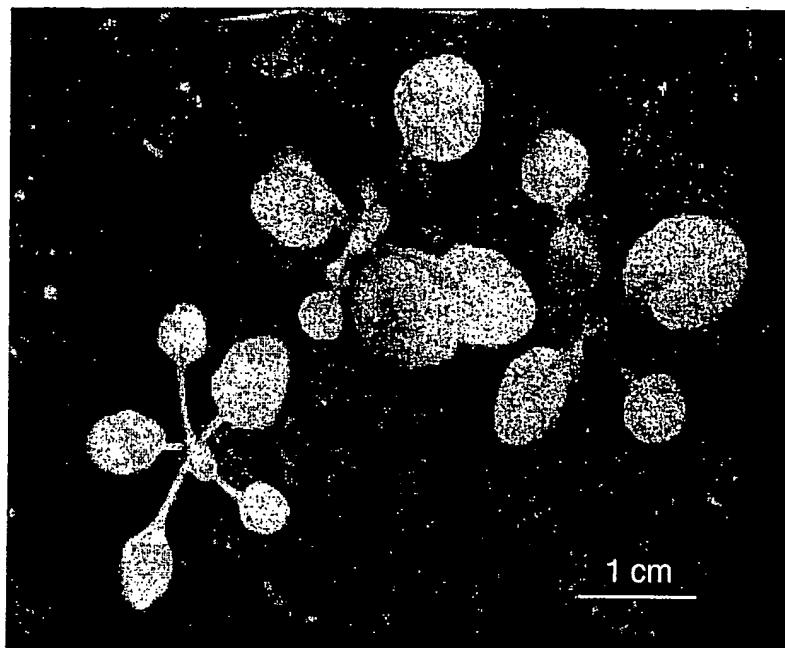


Fig.4

A



B

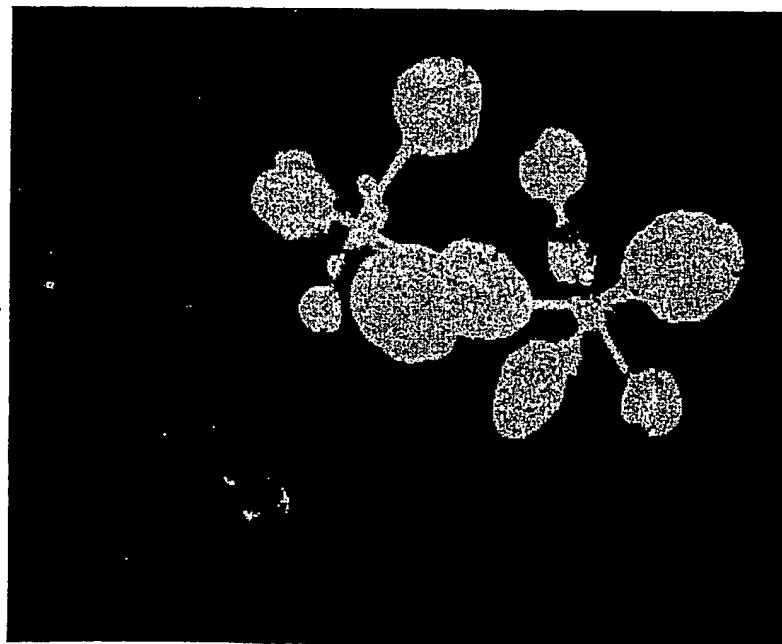


Fig.5

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Plant Science GmbH
 <120> Konstrukte und Verfahren zur Regulation der
 Genexpression
 <130> PD009300062-AT
 <140>
 <141>
 <160> 126
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 495
 <212> DNA
 <213> *Arabidopsis thaliana*
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(492)
 <223> albumine 2S subunit 1
 <400> 1
 atg gca aac aag ttg ttc ctc gtc tgc gca gct ctc gct ctc tgc ttc . 48
 Met Ala Asn Lys Leu Phe Leu Val Cys Ala Ala Leu Ala Leu Cys Phe
 1 5 10 15
 ctc ctc acc aac gct tcc atc tac cgc acc gtc gtt gag ttc gaa gaa . 96
 Leu Leu Thr Asn Ala Ser Ile Tyr Arg Thr Val Val Glu Phe Glu Glu
 20 25 30
 gat gac gcc act aac ccc ata ggc cca aaa atg agg aaa tgc cgc aag . 144
 Asp Asp Ala Thr Asn Pro Ile Gly Pro Lys Met Arg Lys Cys Arg Lys
 35 40 45
 gag ttt cag aaa gaa caa cac cta aga gct tgc cag caa ttg atg ctc . 192
 Glu Phe Gln Lys Glu Gln His Leu Arg Ala Cys Gln Gln Leu Met Leu
 50 55 60
 cag caa gca agg caa ggc cgt agc gat gag ttt gat ttc gaa gac gac . 240
 Gln Gln Ala Arg Gln Gly Arg Ser Asp Glu Phe Asp Phe Glu Asp Asp
 65 70 75 80
 atg gag aac cca cag gga caa cag cag gaa caa cag cta ttc cag cag . 288
 Met Glu Asn Pro Gln Gly Gln Gln Glu Gln Gln Leu Phe Gln Gln
 85 90 95
 tgc tgc aac gag ctt cgc cag gaa gag cca gat tgt gtt tgc ccc acc . 336
 Cys Cys Asn Glu Leu Arg Gln Glu Glu Pro Asp Cys Val Cys Pro Thr
 100 105 110
 ttg aaa caa gct gcc aag gcc gtt aga ctc cag gga cag cac caa cca . 384
 Leu Lys Gln Ala Ala Lys Ala Val Arg Leu Gln Gly Gln His Gln Pro
 115 120 125
 atg caa gtc agg aaa att tac cag aca gcc aag cac ttg ccc aac gtt . 432
 Met Gln Val Arg Lys Ile Tyr Gln Thr Ala Lys His Leu Pro Asn Val
 130 135 140
 tgc gac atc ccg caa gtt gat gtt tgt ccc ttc aac atc cct tca ttc . 480
 Cys Asp Ile Pro Gln Val Asp Val Cys Pro Phe Asn Ile Pro Ser Phe
 145 150 155 160
 cct tct ttc tac taa . 495
 Pro Ser Phe Tyr

<210> 2
 <211> 164
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 2
 Met Ala Asn Lys Leu Phe Leu Val Cys Ala Ala Leu Ala Leu Cys Phe
 1 5 10 15
 Leu Leu Thr Asn Ala Ser Ile Tyr Arg Thr Val Val Glu Phe Glu Glu
 20 25 30
 Asp Asp Ala Thr Asn Pro Ile Gly Pro Lys Met Arg Lys Cys Arg Lys
 35 40 45
 Glu Phe Gln Lys Glu Gln His Leu Arg Ala Cys Gln Gln Leu Met Leu
 50 55 60
 Gln Gln Ala Arg Gln Gly Arg Ser Asp Glu Phe Asp Phe Glu Asp Asp
 65 70 75 80
 Met Glu Asn Pro Gln Gly Gln Gln Glu Gln Gln Leu Phe Gln Gln
 85 90 95
 Cys Cys Asn Glu Leu Arg Gln Glu Glu Pro Asp Cys Val Cys Pro Thr
 100 105 110
 Leu Lys Gln Ala Ala Lys Ala Val Arg Leu Gln Gly Gln His Gln Pro
 115 120 125
 Met Gln Val Arg Lys Ile Tyr Gln Thr Ala Lys His Leu Pro Asn Val
 130 135 140
 Cys Asp Ile Pro Gln Val Asp Val Cys Pro Phe Asn Ile Pro Ser Phe
 145 150 155 160
 Pro Ser Phe Tyr

<210> 3
 <211> 495
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(492)
 <223> albumine 2S subunit 3
 <400> 3
 atg gct aac aag ctc ttc ctc gtc tgc gca act ctc gcc ctc tgc ttc 48
 Met Ala Asn Lys Leu Phe Leu Val Cys Ala Thr Leu Ala Leu Cys Phe
 1 5 10 15
 ctc ctc acc aac gct tcc atc tac cgc acc gtt gtc gaa ttc gaa gaa 96
 Leu Leu Thr Asn Ala Ser Ile Tyr Arg Thr Val Val Glu Phe Glu Glu
 20 25 30
 gat gac gcc agc aac ccc gta ggt cca aga cag aga tgc cag aag gag 144
 Asp Asp Ala Ser Asn Pro Val Gly Pro Arg Gln Arg Cys Gln Lys Glu
 35 40 45
 ttt cag caa tca caa cac cta aga gct tgc cag aga tgg atg agc aag 192
 Phe Gln Gln Ser Gln His Leu Arg Ala Cys Gln Arg Trp Met Ser Lys
 50 55 60

caa atg agg caa gga cgt ggt ggt cct tcc ctc gac gat gag ttc	240
Gln Met Arg Gln Gly Arg Gly Gly Pro Ser Leu Asp Asp Glu Phe	
65 70 75 80	
gat ttc gag ggc ccc cag cag gga tac cag cta ctc cag cag tgc tgc	288
Asp Phe Glu Gly Pro Gln Gln Gly Tyr Gln Leu Leu Gln Gln Cys Cys	
85 90 95	
aac gag ctt cgc cag gaa gag cca gtt tgc gtt tgc ccc acc ttg aaa	336
Asn Glu Leu Arg Gln Glu Glu Pro Val Cys Val Cys Pro Thr Leu Lys	
100 105 110	
caa gct gcc agg gca gtt agc ctc cag gga cag cac gga cca ttc caa	384
Gln Ala Ala Arg Ala Val Ser Leu Gln Gly Gln His Gly Pro Phe Gln	
115 120 125	
tcc agg aaa att tac cag tca gct aag tac ttg cct aac att tgc aag	432
Ser Arg Lys Ile Tyr Gln Ser Ala Lys Tyr Leu Pro Asn Ile Cys Lys	
130 135 140	
atc cag caa gtt ggt gaa tgt ccc ttc cag acc acc atc cct ttc ttc	480
Ile Gln Gln Val Gly Glu Cys Pro Phe Gln Thr Thr Ile Pro Phe Phe	
145 150 155 160	
cct cct tac tac tag	495
Pro Pro Tyr Tyr	
<210> 4	
<211> 164	
<212> PRT	
<213> <i>Arabidopsis thaliana</i>	
<400> 4	
Met Ala Asn Lys Leu Phe Leu Val Cys Ala Thr Leu Ala Leu Cys Phe	
1 5 10 15	
Leu Leu Thr Asn Ala Ser Ile Tyr Arg Thr Val Val Glu Phe Glu Glu	
20 25 30	
Asp Asp Ala Ser Asn Pro Val Gly Pro Arg Gln Arg Cys Gln Lys Glu	
35 40 45	
Phe Gln Gln Ser Gln His Leu Arg Ala Cys Gln Arg Trp Met Ser Lys	
50 55 60	
Gln Met Arg Gln Gly Arg Gly Gly Pro Ser Leu Asp Asp Glu Phe	
65 70 75 80	
Asp Phe Glu Gly Pro Gln Gln Gly Tyr Gln Leu Leu Gln Gln Cys Cys	
85 90 95	
Asn Glu Leu Arg Gln Glu Glu Pro Val Cys Val Cys Pro Thr Leu Lys	
100 105 110	
Gln Ala Ala Arg Ala Val Ser Leu Gln Gly Gln His Gly Pro Phe Gln	
115 120 125	
Ser Arg Lys Ile Tyr Gln Ser Ala Lys Tyr Leu Pro Asn Ile Cys Lys	
130 135 140	
Ile Gln Gln Val Gly Glu Cys Pro Phe Gln Thr Thr Ile Pro Phe Phe	
145 150 155 160	
Pro Pro Tyr Tyr	

<210> 5

<211> 513

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(510)

<223> albumine 2S subunit 2

<400> 5

atg gca aac aag ctc ttc ctc gtc tgc gca a	ct ttc gcc ctc tgc ttc	48
Met Ala Asn Lys Leu Phe Leu Val Cys Ala Thr	Phe Ala Leu Cys Phe	
1	5	10
		15

ctc ctc acc aac gct tcc atc tac cgc act gtt	gtc gag ttc gac gaa	96
Leu Leu Thr Asn Ala Ser Ile Tyr Arg Thr Val	Val Val Glu Phe Asp Glu	
20	25	30

gat gac gcc agc aac ccc atg ggc cca aga cag	aaa tgt cag aag gag	144
Asp Asp Ala Ser Asn Pro Met Gly Pro Arg Gln	Lys Cys Gln Lys Glu	
35	40	45

ttt cag caa tca cag cac cta aga gct tgc cag	aaa ttg atg cgc atg	192
Phe Gln Gln Ser Gln His Leu Arg Ala Cys Gln	Lys Leu Met Arg Met	
50	55	60

caa atg agg caa ggc cgt ggt ggt ccc tcc ctc	gac gat gag ttc	240
Gln Met Arg Gln Gly Arg Gly Gly Pro Ser Leu	Asp Asp Glu Phe	
65	70	75
		80

gat ttg gaa gac gac atc gag aac cca caa ggc	ccc cag cag gga cac	288
Asp Leu Glu Asp Asp Ile Glu Asn Pro Gln Gly	Pro Gln Gln Gly His	
85	90	95

cag atc ctc cag cag tgc tgc agc gag ctt cgc	cag gaa gag cca gtt	336
Gln Ile Leu Gln Gln Cys Ser Glu Leu Arg Gln	Glu Pro Val	
100	105	110

tgt gtt tgc ccc acc ttg aga caa gct gcc agg	gcc gtt agc ctc cag	384
Cys Val Cys Pro Thr Leu Arg Gln Ala Ala Arg	Ala Val Ser Leu Gln	
115	120	125

gga caa cac gga cca ttc caa tcc agg aaa att	tac aag aca gct aag	432
Gly Gln His Gly Pro Phe Gln Ser Arg Lys Ile	Tyr Lys Thr Ala Lys	
130	135	140

tac ttg cct aac att tgc aag atc cag caa gtt	ggt gaa tgc ccc ttc	480
Tyr Leu Pro Asn Ile Cys Lys Ile Gln Gln Val	Gly Glu Cys Pro Phe	
145	150	155
		160

cag acc acc atc cct ttc ctc cct tac taa		513
Gln Thr Thr Ile Pro Phe Phe Pro Pro Tyr		
165	170	

<210> 6

<211> 170

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 6

Met Ala Asn Lys Leu Phe Leu Val Cys Ala Thr	Phe Ala Leu Cys Phe	
1	5	10
		15

Leu Leu Thr Asn Ala Ser Ile Tyr Arg Thr Val	Val Val Glu Phe Asp Glu	
20	25	30

Asp Asp Ala Ser Asn Pro Met Gly Pro Arg Gln	Lys Cys Gln Lys Glu	
35	40	45

Phe Gln Gln Ser Gln His Leu Arg Ala Cys Gln Lys Leu Met Arg Met
 50 55 60
 Gln Met Arg Gln Gly Arg Gly Gly Pro Ser Leu Asp Asp Glu Phe
 65 70 75 80
 Asp Leu Glu Asp Asp Ile Glu Asn Pro Gln Gly Pro Gln Gln Gly His
 85 90 95
 Gln Ile Leu Gln Gln Cys Cys Ser Glu Leu Arg Gln Glu Glu Pro Val
 100 105 110
 Cys Val Cys Pro Thr Leu Arg Gln Ala Ala Arg Ala Val Ser Leu Gln
 115 120 125
 Gly Gln His Gly Pro Phe Gln Ser Arg Lys Ile Tyr Lys Thr Ala Lys
 130 135 140
 Tyr Leu Pro Asn Ile Cys Lys Ile Gln Gln Val Gly Glu Cys Pro Phe
 145 150 155 160
 Gln Thr Thr Ile Pro Phe Phe Pro Pro Tyr
 165 170

<210> 7

<211> 501

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(498)

<223> albumine 2S subunit 4

<400> 7

atg	gcg	aac	aag	ctc	ttc	ctc	gtc	tgc	gca	gct	ctc	gcc	ctg	tgt	ttc	48
Met																
1				5						10					15	
atc	ctc	acc	aac	gct	tcc	tat	cgc	acc	gtt	gtc	gag	ttc	gac	gaa	96	
Ile																
20										25				30		
gat	gac	gcc	agt	aac	ccc	ata	ggc	cca	ata	cag	aaa	tgt	cag	aag	gag	144
Asp																
35										40			45			
ttt	cag	caa	gac	cag	cac	cta	aga	gct	tgc	cag	aga	tgg	atg	cgc	aag	192
Phe	Gln															
50										55		60				
caa	atg	tgg	caa	gga	cgt	ggt	ggt	cct	tcc	ctc	gac	gat	gag	ttc	240	
Gln	Met	Trp	Gln	Gly	Arg	Gly	Gly	Pro	Ser	Leu	Asp	Asp	Glu	Phe		
65										70		75		80		
gat	atg	gaa	gac	gac	atc	gag	aac	ccg	cag	aga	cga	cag	cta	ctc	cag	288
Asp	Met	Glu	Asp	Asp	Ile	Glu	Asn	Pro	Gln	Arg	Arg	Gln	Leu	Leu	Gln	
85										90			95			
aag	tgc	tgc	agc	gag	ctt	cgc	caa	gaa	gag	cca	gtt	tgc	gtt	tgc	ccc	336
Lys	Cys	Cys	Ser	Glu	Leu	Arg	Gln	Glu	Glu	Pro	Val	Cys	Val	Cys	Pro	
100										105			110			
acc	ttg	aga	caa	gct	gcc	aag	gcc	gtt	aga	tgc	gga	cag	caa	cac	384	
Thr	Leu	Arg	Gln	Ala	Ala	Lys	Ala	Val	Arg	Phe	Gln	Gly	Gln	Gln	His	
115										120			125			

caa cca gag caa gtc agg aaa att tac cag gca gct aag tac ttg cct 432
 Gln Pro Glu Gln Val Arg Lys Ile Tyr Gln Ala Ala Lys Tyr Leu Pro
 130 135 140
 aac att tgc aaa atc cag caa gtt ggt gtt tgc ccc ttc cag atc cct 480
 Asn Ile Cys Lys Ile Gln Gln Val Gly Val Cys Pro Phe Gln Ile Pro
 145 150 155 160
 tca atc cct tct tac tac taa 501
 Ser Ile Pro Ser Tyr Tyr
 165

<210> 8
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 8
 Met Ala Asn Lys Leu Phe Leu Val Cys Ala Ala Leu Ala Leu Cys Phe
 1 5 10 15
 Ile Leu Thr Asn Ala Ser Val Tyr Arg Thr Val Val Glu Phe Asp Glu
 20 25 30
 Asp Asp Ala Ser Asn Pro Ile Gly Pro Ile Gln Lys Cys Gln Lys Glu
 35 40 45
 Phe Gln Gln Asp Gln His Leu Arg Ala Cys Gln Arg Trp Met Arg Lys
 50 55 60
 Gln Met Trp Gln Gly Arg Gly Gly Pro Ser Leu Asp Asp Glu Phe
 65 70 75 80
 Asp Met Glu Asp Asp Ile Glu Asn Pro Gln Arg Arg Gln Leu Leu Gln
 85 90 95
 Lys Cys Cys Ser Glu Leu Arg Gln Glu Glu Pro Val Cys Val Cys Pro
 100 105 110
 Thr Leu Arg Gln Ala Ala Lys Ala Val Arg Phe Gln Gly Gln Gln His
 115 120 125
 Gln Pro Glu Gln Val Arg Lys Ile Tyr Gln Ala Ala Lys Tyr Leu Pro
 130 135 140
 Asn Ile Cys Lys Ile Gln Gln Val Gly Val Cys Pro Phe Gln Ile Pro
 145 150 155 160
 Ser Ile Pro Ser Tyr Tyr
 165

<210> 9
 <211> 1473
 <212> DNA
 <213> *Brassica napus*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(1470)
 <223> *cruciferin*

<400> 9
 atg gct cgg ctc tca tct ctt ctc tct ttt tcc tta gca ctt ttg atc 48
 Met Ala Arg Leu Ser Ser Leu Leu Ser Phe Ser Leu Ala Leu Leu Ile
 1 5 10 15

ttt ctc cat ggc tct aca gct caa cag ttt cca aac gag tgt cag cta	20	25	30	96
Phe Leu His Gly Ser Thr Ala Gln Gln Phe Pro Asn Glu Cys Gln Leu				
gac cag ctc aat gca ctg gag ccg tca cac gta ctt aag gct gag gct	35	40	45	144
Asp Gln Leu Asn Ala Leu Glu Pro Ser His Val Leu Lys Ala Glu Ala				
ggt cgc atc gag gtg tgg gac cac cac gct cct cag cta cgt tgc tct	50	55	60	192
Gly Arg Ile Glu Val Trp Asp His His Ala Pro Gln Leu Arg Cys Ser				
ggt gtc tcc ttt gta cgt tac atc atc gag tct aag ggt ctc tac ttg	65	70	75	240
Gly Val Ser Phe Val Arg Tyr Ile Ile Glu Ser Lys Gly Leu Tyr Leu				
ccc tct ttc ttt agc acc gcg aag ctc tcc ttc gtg gct aaa gga gaa	85	90	95	288
Pro Ser Phe Phe Ser Thr Ala Lys Leu Ser Phe Val Ala Lys Gly Glu				
ggt ctt atg ggg aga gtg gtc cct gga tgc gcc gag aca ttc cag gac	100	105	110	336
Gly Leu Met Gly Arg Val Val Pro Gly Cys Ala Glu Thr Phe Gln Asp				
tca tca gtg ttt caa cca agc ggt ggt agc ccc tcg gga gaa ggt cag	115	120	125	384
Ser Ser Val Phe Gln Pro Ser Gly Gly Ser Pro Ser Gly Glu Gly Gln				
ggc caa gga caa caa ggt cag ggc caa ggc cac caa ggt caa ggc caa	130	135	140	432
Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly His Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln				
gga caa cag ggc caa caa ggt cag caa gga caa cag agt caa ggc cag	145	150	155	480
Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Ser Gln Gly Gln				
ggc ttc cgt gat atg cac cag aaa gtg gag cac ata agg act ggg gac	165	170	175	528
Gly Phe Arg Asp Met His Gln Lys Val Glu His Ile Arg Thr Gly Asp				
acc atc gct aca cat ccc ggt gta gcc caa tgg ttc tac aac gac gga	180	185	190	576
Thr Ile Ala Thr His Pro Gly Val Ala Gln Trp Phe Tyr Asn Asp Gly				
aac caa cca ctt gtc atc gtt tcc gtc ctc gat tta gcc agc cac cag	195	200	205	624
Asn Gln Pro Leu Val Ile Val Ser Val Leu Asp Leu Ala Ser His Gln				
aat cag ctc gac cgc aac cca agg cca ttt tac tta gcc gga aac aac	210	215	220	672
Asn Gln Leu Asp Arg Asn Pro Arg Pro Phe Tyr Leu Ala Gly Asn Asn				
cca caa ggc caa gta tgg ata gaa gga cgc gag caa cag cca caa aag	225	230	235	720
Pro Gln Gly Gln Val Trp Ile Glu Gly Arg Glu Gln Gln Pro Gln Lys				
aac atc ctt aat ggc ttc aca cca gag gtt ctt gct aaa gct ttc aag	245	250	255	768
Asn Ile Leu Asn Gly Phe Thr Pro Glu Val Leu Ala Lys Ala Phe Lys				
atc gat gtt agg aca gcg caa caa ctt cag aac cag caa gac aac cgt	260	265	270	816
Ile Asp Val Arg Thr Ala Gln Gln Leu Gln Asn Gln Gln Asp Asn Arg				
gga aac att atc cga gtc caa ggc cca ttc agt gtc att agg ccg cct	275	280	285	864
Gly Asn Ile Ile Arg Val Gln Gly Pro Phe Ser Val Ile Arg Pro Pro				

ttg agg agt cag aga ccg cag gag aca gaa gtt aac ggt tta gaa gag	912
Leu Arg Ser Gln Arg Pro Gln Glu Thr Glu Val Asn Gly Leu Glu Glu	
290 295 300	
acc ata tgc agc gcg agg tgc acc gat aac ctc gat gac cca tct aat	960
Thr Ile Cys Ser Ala Arg Cys Thr Asp Asn Leu Asp Asp Pro Ser Asn	
305 310 315 320	
gct gac gta tac aag cca cag ctc ggt tac atc agc act ctg aac agc	1008
Ala Asp Val Tyr Lys Pro Gln Leu Gly Tyr Ile Ser Thr Leu Asn Ser	
325 330 335	
tat gat ctc ccc atc ctt cgc ttc ctt cgt ctc tca gcc ctc cgt gga	1056
Tyr Asp Leu Pro Ile Leu Arg Phe Leu Arg Leu Ser Ala Leu Arg Gly	
340 345 350	
tct atc cgt caa aac gcg atg gtg ctt cca cag tgg aac gca aac gca	1104
Ser Ile Arg Gln Asn Ala Met Val Leu Pro Gln Trp Asn Ala Asn Ala	
355 360 365	
aac gcg gtt ctc tac gtg aca gac ggg gaa gcc cat gtg cag gtg gtt	1152
Asn Ala Val Leu Tyr Val Thr Asp Gly Glu Ala His Val Gln Val Val	
370 375 380	
aac gac aac ggt gac aga gtg ttc gac gga caa gtc tct caa gga cag	1200
Asn Asp Asn Gly Asp Arg Val Phe Asp Gly Gln Val Ser Gln Gly Gln	
385 390 395 400	
cta ctt tcc ata cca caa ggt ttc tcc gtg gtg aaa cgc gca aca agc	1248
Leu Leu Ser Ile Pro Gln Gly Phe Ser Val Val Lys Arg Ala Thr Ser	
405 410 415	
gaa cag ttc cgg tgg atc gag ttc aag aca aac gca aac gca cag atc	1296
Glu Gln Phe Arg Trp Ile Glu Phe Lys Thr Asn Ala Asn Ala Gln Ile	
420 425 430	
aac aca ctt gct gga cga acc tcg gtc ttg aga ggt tta cca tta gag	1344
Asn Thr Leu Ala Gly Arg Thr Ser Val Leu Arg Gly Leu Pro Leu Glu	
435 440 445	
gtc ata tcc aat ggg tac caa atc tca ctc gaa gaa gca aga agg gtt	1392
Val Ile Ser Asn Gly Tyr Gln Ile Ser Leu Glu Ala Arg Arg Val	
450 455 460	
aag ttc aac acg atc gag acc act ttg acg cac agc agt ggc cca gct	1440
Lys Phe Asn Thr Ile Glu Thr Thr Leu Thr His Ser Ser Gly Pro Ala	
465 470 475 480	
agc tac gga ggg cca agg aag gct gat gct taa	1473
Ser Tyr Gly Gly Pro Arg Lys Ala Asp Ala	
485 490	
<210> 10	
<211> 490	
<212> PRT	
<213> Brassica napus	
<400> 10	
Met Ala Arg Leu Ser Ser Leu Leu Ser Phe Ser Leu Ala Leu Leu Ile	
1 5 10 15	
Phe Leu His Gly Ser Thr Ala Gln Gln Phe Pro Asn Glu Cys Gln Leu	
20 25 30	
Asp Gln Leu Asn Ala Leu Glu Pro Ser His Val Leu Lys Ala Glu Ala	
35 40 45	

Gly Arg Ile Glu Val Trp Asp His His Ala Pro Gln Leu Arg Cys Ser
 50 55 60
 Gly Val Ser Phe Val Arg Tyr Ile Ile Glu Ser Lys Gly Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Pro Ser Phe Phe Ser Thr Ala Lys Leu Ser Phe Val Ala Lys Gly Glu
 85 90 95
 Gly Leu Met Gly Arg Val Val Pro Gly Cys Ala Glu Thr Phe Gln Asp
 100 105 110
 Ser Ser Val Phe Gln Pro Ser Gly Gly Ser Pro Ser Gly Glu Gly Gln
 115 120 125
 Gly Gln Gly Gln Gln Gly Gln Gly Gln Gly His Gln Gly Gln Gly Gln
 130 135 140
 Gly Gln Gln Gly Gln Gln Gly Gln Gln Gln Ser Gln Gly Gln
 145 150 155 160
 Gly Phe Arg Asp Met His Gln Lys Val Glu His Ile Arg Thr Gly Asp
 165 170 175
 Thr Ile Ala Thr His Pro Gly Val Ala Gln Trp Phe Tyr Asn Asp Gly
 180 185 190
 Asn Gln Pro Leu Val Ile Val Ser Val Leu Asp Leu Ala Ser His Gln
 195 200 205
 Asn Gln Leu Asp Arg Asn Pro Arg Pro Phe Tyr Leu Ala Gly Asn Asn
 210 215 220
 Pro Gln Gly Gln Val Trp Ile Glu Gly Arg Glu Gln Gln Pro Gln Lys
 225 230 235 240
 Asn Ile Leu Asn Gly Phe Thr Pro Glu Val Leu Ala Lys Ala Phe Lys
 245 250 255
 Ile Asp Val Arg Thr Ala Gln Gln Leu Gln Asn Gln Gln Asp Asn Arg
 260 265 270
 Gly Asn Ile Ile Arg Val Gln Gly Pro Phe Ser Val Ile Arg Pro Pro
 275 280 285
 Leu Arg Ser Gln Arg Pro Gln Glu Thr Glu Val Asn Gly Leu Glu Glu
 290 295 300
 Thr Ile Cys Ser Ala Arg Cys Thr Asp Asn Leu Asp Asp Pro Ser Asn
 305 310 315 320
 Ala Asp Val Tyr Lys Pro Gln Leu Gly Tyr Ile Ser Thr Leu Asn Ser
 325 330 335
 Tyr Asp Leu Pro Ile Leu Arg Phe Leu Arg Leu Ser Ala Leu Arg Gly
 340 345 350
 Ser Ile Arg Gln Asn Ala Met Val Leu Pro Gln Trp Asn Ala Asn Ala
 355 360 365
 Asn Ala Val Leu Tyr Val Thr Asp Gly Glu Ala His Val Gln Val Val
 370 375 380
 Asn Asp Asn Gly Asp Arg Val Phe Asp Gly Gln Val Ser Gln Gly Gln
 385 390 395 400
 Leu Leu Ser Ile Pro Gln Gly Phe Ser Val Val Lys Arg Ala Thr Ser
 405 410 415
 Glu Gln Phe Arg Trp Ile Glu Phe Lys Thr Asn Ala Asn Ala Gln Ile
 420 425 430

<222> (1)...(642)

<223> avenin

<400> 107

atg aag atc ttc ttc ttc tta gct ctc ctt gct ctg gta gtg agc gcc	48
Met Lys Ile Phe Phe Leu Ala Leu Leu Ala Leu Val Val Ser Ala	
1 5 10 15	
acc ttt gca caa tat gca gaa tct gac ggt agt tat gag gaa gtg gag	96
Thr Phe Ala Gln Tyr Ala Glu Ser Asp Gly Ser Tyr Glu Glu Val Glu	
20 25 30	
ggt tct cat gat cga tgc caa caa cat cag atg aag ctg gac tct tgc	144
Gly Ser His Asp Arg Cys Gln Gln His Gln Met Lys Leu Asp Ser Cys	
35 40 45	
aga gag tac gtg gcg gag cgg tgc aca acg atg aga gat ttt ccg atc	192
Arg Glu Tyr Val Ala Glu Arg Cys Thr Thr Met Arg Asp Phe Pro Ile	
50 55 60	
acc tgg cca tgg aaa tgg tgg aag ggt ggt tgc gag gag ctc cgc aat	240
Thr Trp Pro Trp Lys Trp Lys Gly Gly Cys Glu Glu Leu Arg Asn	
65 70 75 80	
gag tgc tgc caa ctg ttg ggc cag atg cca tcg gag tgt cgc tgt gat	288
Glu Cys Cys Gln Leu Leu Gly Gln Met Pro Ser Glu Cys Arg Cys Asp	
85 90 95	
gcg att tgg aga tca atc cag cgc gag ctt ggt ggc ttc ttt gga act	336
Ala Ile Trp Arg Ser Ile Gln Arg Glu Leu Gly Phe Phe Gly Thr	
100 105 110	
caa caa ggt ctg ata ggg aaa agg ttg aag ata gcc aag agt ttg ccc	384
Gln Gln Gly Leu Ile Gly Lys Arg Leu Lys Ile Ala Lys Ser Leu Pro	
115 120 125	
acg cag tca aca tgg gcc ctg agt gca ata tcc cca aac tcc atg gtt	432
Thr Gln Ser Thr Trp Ala Leu Ser Ala Ile Ser Pro Asn Ser Met Val	
130 135 140	
agc cac att gct gga aag agc tcc att ctt cgt gcc ttg ccc gtg gat	480
Ser His Ile Ala Gly Lys Ser Ser Ile Leu Arg Ala Leu Pro Val Asp	
145 150 155 160	
gtc ctc gcc aat gca tac cgc att tcc agg caa gaa gcc cga aac ctc	528
Val Leu Ala Asn Ala Tyr Arg Ile Ser Arg Gln Glu Ala Arg Asn Leu	
165 170 175	
aaa aac aac agg gga caa gag tct ggt gta ttc act cca aaa ttt acc	576
Lys Asn Asn Arg Gly Gln Glu Ser Gly Val Phe Thr Pro Lys Phe Thr	
180 185 190	
caa acg agc ttc caa cct tat cca gag ggc gag gat gag tca tct ttg	624
Gln Thr Ser Phe Gln Pro Tyr Pro Glu Gly Glu Asp Glu Ser Ser Leu	
195 200 205	
att aat aag gca tca gag taa	645
Ile Asn Lys Ala Ser Glu	
210	
<210> 108	
<211> 214	
<212> PRT	
<213> Avena sativa	
<400> 108	
Met Lys Ile Phe Phe Leu Ala Leu Leu Ala Leu Val Val Ser Ala	
1 5 10 15	

111

Thr Phe Ala Gln Tyr Ala Glu Ser Asp Gly Ser Tyr Glu Glu Val Glu
 20 25 30
 Gly Ser His Asp Arg Cys Gln Gln His Gln Met Lys Leu Asp Ser Cys
 35 40 45
 Arg Glu Tyr Val Ala Glu Arg Cys Thr Thr Met Arg Asp Phe Pro Ile
 50 55 60
 Thr Trp Pro Trp Lys Trp Trp Lys Gly Gly Cys Glu Glu Leu Arg Asn
 65 70 75 80
 Glu Cys Cys Gln Leu Leu Gly Gln Met Pro Ser Glu Cys Arg Cys Asp
 85 90 95
 Ala Ile Trp Arg Ser Ile Gln Arg Glu Leu Gly Phe Phe Gly Thr
 100 105 110
 Gln Gln Gly Leu Ile Gly Lys Arg Leu Lys Ile Ala Lys Ser Leu Pro
 115 120 125
 Thr Gln Ser Thr Trp Ala Leu Ser Ala Ile Ser Pro Asn Ser Met Val
 130 135 140
 Ser His Ile Ala Gly Lys Ser Ser Ile Leu Arg Ala Leu Pro Val Asp
 145 150 155 160
 Val Leu Ala Asn Ala Tyr Arg Ile Ser Arg Gln Glu Ala Arg Asn Leu
 165 170 175
 Lys Asn Asn Arg Gly Gln Glu Ser Gly Val Phe Thr Pro Lys Phe Thr
 180 185 190
 Gln Thr Ser Phe Gln Pro Tyr Pro Glu Gly Glu Asp Glu Ser Ser Leu
 195 200 205
 Ile Asn Lys Ala Ser Glu
 210

<210> 109
 <211> 1044
 <212> DNA
 <213> Hordeum vulgare

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1041)
 <223> c-hordein

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (481)..(482)
 <223> /transl_except=(pos:481..483,aa:OTHER)

<400> 109
 atg aag acg ttc ctc acc ttt gtc ctc ctt gcc atg gcg atg agc atc 48
 Met Lys Thr Phe Leu Thr Phe Val Leu Leu Ala Met Ala Met Ser Ile
 1 5 10 15
 gtc act acc gct agg cag cta aac cct agc cac caa gag ttg caa tca 96
 Val Thr Thr Ala Arg Gln Leu Asn Pro Ser His Gln Glu Leu Gln Ser
 20 25 30
 cca caa caa cca ttt ctg aaa caa caa tca tat ctg caa caa cca tat 144
 Pro Gln Gln Pro Phe Leu Lys Gln Gln Ser Tyr Leu Gln Gln Pro Tyr
 35 40 45

cca caa caa cca tat cta ccg cag caa cca ttc ccc aca ccc caa caa	192
Pro Gln Gln Pro Tyr Leu Pro Gln Gln Pro Phe Pro Thr Pro Gln Gln	
50 55 60	
ttt ttc ccc tat cta cca cag caa aca ttt ccc cca tcc caa caa cca	240
Phe Phe Pro Tyr Leu Pro Gln Gln Thr Phe Pro Pro Ser Gln Gln Pro	
65 70 75 80	
aac ccc cta caa cca caa cca ttc ccc ctg caa ccc caa cca cca	288
Asn Pro Leu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Leu Gln Pro Gln Pro Pro	
85 90 95	
caa caa cct ttt cct cag ccc caa caa cca aat ccc cag caa cca caa	336
Gln Gln Pro Phe Pro Gln Gln Pro Asn Pro Gln Gln Pro Gln	
100 105 110	
caa cct ttc ccc cgg caa cca caa caa ata gta ccc cag caa cca caa	384
Gln Pro Phe Pro Arg Gln Pro Gln Gln Ile Val Pro Gln Gln Pro Gln	
115 120 125	
caa cca ttc cct cag caa cca caa cct ttt cct cag ccc caa caa	432
Gln Pro Phe Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Gln	
130 135 140	
cca ttc tct tgg caa cca caa cca ttt ctc cag ccc cta caa cta	480
Pro Phe Ser Trp Gln Pro Gln Gln Pro Phe Leu Gln Pro Leu Gln Leu	
145 150 155 160	
tag ccc ctg caa gca caa caa cca ttc ccc ttg caa cct caa cta cca	528
Pro Leu Gln Ala Gln Gln Pro Phe Pro Leu Gln Pro Gln Leu Pro	
165 170 175	
ttt ccg caa ccc caa caa cca att gga cag caa cca aaa caa cca ctc	576
Phe Pro Gln Pro Gln Gln Pro Ile Gly Gln Gln Pro Lys Gln Pro Leu	
180 185 190	
ctg cag caa cca caa aca att ccc cag caa cca caa cca cca ttc	624
Leu Gln Gln Pro Gln Gln Thr Ile Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe	
195 200 205	
ccc ctg cag ccg caa caa cca ttc ccc caa caa cca caa cca cca ctt	672
Pro Leu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Leu	
210 215 220	
ccc caa caa ccc caa caa ata att tcc cag caa ccc caa caa cca ttc	720
Pro Gln Gln Pro Gln Gln Ile Ile Ser Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe	
225 230 235 240	
cct cta caa cct caa caa cca ttc ccc caa ccc caa cca ttc ccc cag	768
Pro Leu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Pro Phe Pro Gln	
245 250 255	
gag caa ccc caa caa gca ttc ccc cta caa ccg caa caa cca ttc ccc	816
Glu Gln Pro Gln Gln Ala Phe Pro Leu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro	
260 265 270	
gag gaa tca gaa caa ata att acc caa caa cca ttc cct cta caa cca	864
Glu Glu Ser Glu Gln Ile Ile Thr Gln Gln Pro Phe Pro Leu Gln Pro	
275 280 285	
caa caa ctg ttc ccc cag caa caa caa cca ctt ccc cag ccc caa	912
Gln Gln Leu Phe Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Leu Pro Gln Pro Gln	
290 295 300	
caa cca ttc cgc caa cta cca aaa tat ata att ccc cag caa cct caa	960
Gln Pro Phe Arg Gln Leu Pro Lys Tyr Ile Ile Pro Gln Gln Pro Gln	
305 310 315 320	

caa cca ttc ctt ctg caa cca cac caa cct cag caa cct tat gca caa 1008
 Gln Pro Phe Leu Leu Gln Pro His Gln Pro Gln Gln Pro Tyr Ala Gln
 325 . 330 335
 caa gac atc tgg agt gat ata gcc ctc ttg ggc taa 1044
 Gln Asp Ile Trp Ser Asp Ile Ala Leu Leu Gly
 340 345

<210> 110
 <211> 160
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 110
 Met Lys Thr Phe Leu Thr Phe Val Leu Leu Ala Met Ala Met Ser Ile
 1 5 10 15
 Val Thr Thr Ala Arg Gln Leu Asn Pro Ser His Gln Glu Leu Gln Ser
 20 25 30
 Pro Gln Gln Pro Phe Leu Lys Gln Gln Ser Tyr Leu Gln Gln Pro Tyr
 35 40 45
 Pro Gln Gln Pro Tyr Leu Pro Gln Gln Pro Phe Pro Thr Pro Gln Gln
 50 55 60
 Phe Phe Pro Tyr Leu Pro Gln Gln Thr Phe Pro Pro Ser Gln Gln Pro
 65 70 75 80
 Asn Pro Leu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Leu Gln Pro Gln Pro Pro
 85 90 95
 Gln Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Gln Pro Asn Pro Gln Gln Pro Gln
 100 105 110
 Gln Pro Phe Pro Arg Gln Pro Gln Gln Ile Val Pro Gln Gln Pro Gln
 115 120 125
 Gln Pro Phe Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Gln
 130 135 140
 Pro Phe Ser Trp Gln Pro Gln Gln Pro Phe Leu Gln Pro Leu Gln Leu
 145 150 155 160

<210> 111
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 111
 Pro Leu Gln Ala Gln Gln Pro Phe Pro Leu Gln Pro Gln Leu Pro Phe
 1 5 10 15
 Pro Gln Pro Gln Gln Pro Ile Gly Gln Gln Pro Lys Gln Pro Leu Leu
 20 25 30
 Gln Gln Pro Gln Gln Thr Ile Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro
 35 40 45
 Leu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Leu Pro
 50 55 60
 Gln Gln Pro Gln Gln Ile Ile Ser Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro
 65 70 75 80
 Leu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Pro Phe Pro Gln Glu
 85 90 95
 Gln Pro Gln Gln Ala Phe Pro Leu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Glu
 100 105 110
 Glu Ser Glu Gln Ile Ile Thr Gln Gln Pro Phe Pro Leu Gln Pro Gln
 115 120 125
 Gln Leu Phe Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Leu Pro Gln Pro Gln Gln
 130 135 140
 Pro Phe Arg Gln Leu Pro Lys Tyr Ile Ile Pro Gln Gln Pro Gln Gln
 145 150 155 160

Pro Phe Leu Leu Gln Pro His Gln Pro Gln Gln Pro Tyr Ala Gln Gln
 165 170 175
 Asp Ile Trp Ser Asp Ile Ala Leu Leu Gly
 180 185

<210> 112
 <211> 924
 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(921)
 <223> glutenin-1D1

<400> 112

atg aag acc ttc ctc gtc ttt gcc ctc ctc gcc gtt gcg gcg aca agt	48
Met Lys Thr Phe Leu Val Phe Ala Leu Leu Ala Val Ala Ala Thr Ser	
1 5 10 15	
gca att gcg cag atg gag act aga tgc atc cct ggt ttg gag aga cca	96
Ala Ile Ala Gln Met Glu Thr Arg Cys Ile Pro Gly Leu Glu Arg Pro	
20 25 30	
tgg cag cag caa cca tta cca cca caa cag aca ttt cca caa cca cca	144
Trp Gln Gln Pro Leu Pro Pro Gln Gln Thr Phe Pro Gln Gln Pro	
35 40 45	
cta ttt tca caa caa caa caa caa cta ttt cct caa caa cca tca	192
Leu Phe Ser Gln Gln Gln Gln Gln Leu Phe Pro Gln Gln Pro Ser	
50 55 60	
ttt tcg cag caa caa cca cca ttt tgg cag caa caa cca cca cca ttt tct	240
Phe Ser Gln Gln Gln Pro Pro Phe Trp Gln Gln Gln Pro Pro Phe Ser	
65 70 75 80	
cag caa caa cca att cta cca cag caa cca cca ttt tcg cag caa caa	288
Gln Gln Gln Pro Ile Leu Pro Gln Gln Pro Pro Phe Ser Gln Gln Gln	
85 90 95	
caa cta gtt cta ccg caa caa cca cca ttt tca cag caa caa cca	336
Gln Leu Val Leu Pro Gln Gln Pro Pro Phe Ser Gln Gln Gln Pro	
100 105 110	
gtt tta cct cca caa caa tca cct ttt cca caa caa caa caa cac	384
Val Leu Pro Pro Gln Gln Ser Pro Phe Pro Gln Gln Gln Gln His	
115 120 125	
caa cag ctg gtg caa caa caa atc cct gtt cag cca tcc att ttg	432
Gln Gln Leu Val Gln Gln Ile Pro Val Val Gln Pro Ser Ile Leu	
130 135 140	
cag cag cta aac cca tgc aag gta ttc ctc cag cag cag tgc agc cct	480
Gln Gln Leu Asn Pro Cys Lys Val Phe Leu Gln Gln Gln Cys Ser Pro	
145 150 155 160	
gtg gca atg cca caa cgt ctt gct agg tcg caa atg ttg cag cag agc	528
Val Ala Met Pro Gln Arg Leu Ala Arg Ser Gln Met Leu Gln Gln Ser	
165 170 175	
agt tgc cat gtg atg caa caa caa tgt tgc cag cag ttg ccg caa atc	576
Ser Cys His Val Met Gln Gln Cys Cys Gln Gln Leu Pro Gln Ile	
180 185 190	
ccc cag caa tcc cgc tat gag gca atc cgt gct atc atc tac tcc atc	624
Pro Gln Gln Ser Arg Tyr Glu Ala Ile Arg Ala Ile Ile Tyr Ser Ile	
195 200 205	

115

atc ctg caa gaa caa caa cag gtt cag ggt tcc atc caa tct cag cag	672
Ile Leu Gln Glu Gln Gln Val Gln Gly Ser Ile Gln Ser Gln Gln	
210 215 220	
cag caa ccc caa cag ttg ggc caa tgt gtt tcc caa ccc caa cag cag	720
Gln Gln Pro Gln Gln Leu Gly Gln Cys Val Ser Gln Pro Gln Gln Gln	
225 230 235 240	
tcg cag cag caa ctc ggg caa caa cct caa caa caa ttg gca cag	768
Ser Gln Gln Leu Gly Gln Pro Gln Gln Gln Leu Ala Gln	
245 250 255	
ggt acc ttt ttg cag cca cac cag ata gct cag ctt gag gtg atg act	816
Gly Thr Phe Leu Gln Pro His Gln Ile Ala Gln Leu Glu Val Met Thr	
260 265 270	
tcc att gcg ctc cgt atc ctg cca acg atg tgc agt gtt aat gtg ccg	864
Ser Ile Ala Leu Arg Ile Leu Pro Thr Met Cys Ser Val Asn Val Pro	
275 280 285	
ttg tac aga acc acc act agt gtg cca ttc ggc gtt ggc acc gga gtt	912
Leu Tyr Arg Thr Thr Ser Val Pro Phe Gly Val Gly Thr Gly Val	
290 295 300	
ggt gcc tac tga	924
Gly Ala Tyr	
305	
<210> 113	
<211> 307	
<212> PRT	
<213> Triticum aestivum	
<400> 113	
Met Lys Thr Phe Leu Val Phe Ala Leu Leu Ala Val Ala Ala Thr Ser	
1 5 10 15	
Ala Ile Ala Gln Met Glu Thr Arg Cys Ile Pro Gly Leu Glu Arg Pro	
20 25 30	
Trp Gln Gln Gln Pro Leu Pro Pro Gln Gln Thr Phe Pro Gln Gln Pro	
35 40 45	
Leu Phe Ser Gln Gln Gln Gln Gln Leu Phe Pro Gln Gln Pro Ser	
50 55 60	
Phe Ser Gln Gln Gln Pro Pro Phe Trp Gln Gln Pro Pro Phe Ser	
65 70 75 80	
Gln Gln Gln Pro Ile Leu Pro Gln Gln Pro Pro Phe Ser Gln Gln Gln	
85 90 95	
Gln Leu Val Leu Pro Gln Gln Pro Pro Phe Ser Gln Gln Gln Pro	
100 105 110	
Val Leu Pro Pro Gln Gln Ser Pro Phe Pro Gln Gln Gln Gln His	
115 120 125	
Gln Gln Leu Val Gln Gln Ile Pro Val Val Gln Pro Ser Ile Leu	
130 135 140	
Gln Gln Leu Asn Pro Cys Lys Val Phe Leu Gln Gln Cys Ser Pro	
145 150 155 160	
Val Ala Met Pro Gln Arg Leu Ala Arg Ser Gln Met Leu Gln Gln Ser	
165 170 175	
Ser Cys His Val Met Gln Gln Gln Cys Cys Gln Gln Leu Pro Gln Ile	
180 185 190	

116

Pro Gln Gln Ser Arg Tyr Glu Ala Ile Arg Ala Ile Ile Tyr Ser Ile
 195 200 205
 Ile Leu Gln Glu Gln Gln Val Gln Gly Ser Ile Gln Ser Gln Gln
 210 215 220
 Gln Gln Pro Gln Gln Leu Gly Gln Cys Val Ser Gln Pro Gln Gln Gln
 225 230 235 240
 Ser Gln Gln Gln Leu Gly Gln Gln Pro Gln Gln Gln Leu Ala Gln
 245 250 255
 Gly Thr Phe Leu Gln Pro His Gln Ile Ala Gln Leu Glu Val Met Thr
 260 265 270
 Ser Ile Ala Leu Arg Ile Leu Pro Thr Met Cys Ser Val Asn Val Pro
 275 280 285
 Leu Tyr Arg Thr Thr Ser Val Pro Phe Gly Val Gly Thr Gly Val
 290 295 300
 Gly Ala Tyr
 305

<210> 114

<211> 8482

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: binary
expression vector

<400> 114

ttccatggac atacaatgg acgaacggat aaacctttc acgcccttt aaatatccga 60
 ttattcta ataaacgtctt ttctcttagg ttacccgccc aatataatcct gtcaaacact 120
 gatagttaa actgaaggcg gaaaaacgaca atcagatcta gtaggaaaca gctatgacca 180
 tgattacgcc aatcaccact ttgtacaaga aagctgggtc tagatgacgg acaatcagta 240
 aattgaacgg agaatattat tcataaaaaat acgatagtaa cgggtgatat attcattaga 300
 atgaaccgaa accggcggta aggatcttagt ctacacatgc tcaggtttt tacaacgtgc 360
 acaacagaat tgaagcaaa tatcatgcga tcataggcgt ctgcacatatc tcattaaagc 420
 aggaggcctt ctagactgca ggcggccccc caccgcggtg ggctggctat gaagaaatta 480
 taatcgtgta aaacttagt agtgtgtatg aatgaaagta ttgcaaaatc ctcattatat 540
 agactacatg cataactagt tgcataatgg tttgtgttt tcttcattat tgcatcctcc 600
 aagtggatgt catgttttta ccatggctt ccatgcaat catttccaaa atattttaa 660
 actttccaca gggcatccat gcatgcacct caaaacttgt gtgtggtaac attgttgtct 720
 taaaaaatta ctaaacctt tgcacatgt acgttcatgc acctcaaatc ttgtgtggta 780
 ccattattat cctcaagaat tattgaatgt ttgggtata tgccatccat gcagcattgc 840
 aacaattaaa tctccaaacc ttgtggtacc atattcactc actttaattc tcctatagta 900
 gaaatattag caaatattta catttccagt tgatttagt atgtatttag aagacaaaaaa 960
 taatttagaa tcaattaatc aacttgcaaa ttgctaagtg ttggcaacg ttagcataaaa 1020
 aggtgttata aatttagtac caaatataaa aatttacatgc aaatcaaata cataacacac 1080
 atagaaaaac aaaaacaaat tacaagggtt tagacgttta gtggcaatgt gtaaatttgc 1140
 tcgactgaat tggcccttt aaggcctgtt tttgtacaa acttgtgata attcaactggc 1200
 cgtcgttta caacgactca ggatcctgtc aaacactgtat agtttaact gaaggcggga 1260
 aacgacaatc tgatcatgag cggagaatta agggagtcac gttatgaccc cggccgatga 1320
 cgcgggacaa gcccgtttac gtttggact gacagaaccc caacgttcaa ggagccactc 1380
 agccgcgggt ttctggagtt taatgagcta agcacatacg tcagaaacca ttattgcgcg 1440
 ttcaaaaatgc gcctaagggtc actatcagct agccaaatatt tcttgtaaaa aatgctccac 1500
 tgacgttcca taaattcccc tcggtatcca attagagtct catattcaact ctcataatccaa 1560
 ataatctgca ccggatctgg atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt gcacgcagg 1620
 tctccggccg cttgggtgga gaggcttattc ggctatgact gggcacaaca gacaatcggc 1680

tgctctgtat ccggcgtgtt ccggcgtgtca gcgcaggggc gcccgggtct ttttgtcaag 1740
accgacacctgt ccgggtccctt gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct atcgtggctg 1800
gccacgacgg gegtccctt cgcagctgt ctcgacgttgc tcactgaagc gggaaaggac 1860
tggctgctat tggcgaagt gcccggcag gatctccctgt catctcacct tgctccctgcc 1920
gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga tccggcttacc 1980
tgcccattcg accacaaggc gaaacatcgc atcgagcggc cacgtactcg gatggaagcc 2040
ggtcttgc tgcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcc 2100
ttcgccaggc tcaaggcgcg catgcccgc ggcgaggatc tcgtcggtac ccatggcgat 2160
gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat ggccgccttt ctggattcat cgactgtggc 2220
cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctacccgtga tattgctgaa 2280
gagcttggcg gccaatgggc tgaccgttcc tcgtgtgtt acggtatcgc cgctcccgat 2340
tcgcagcga tcgccttcta tcgcottctt gacgaggatc tctgagcggg acccaagctc 2400
tagatcttgc tgcgttcgga tatttcgtg gagttcccgac cacagacccg gatgatcccc 2460
gatcgttcaa acatttggca ataaagtttca ttaagattga atcctgttgc cggtcttgcg 2520
atgattatca tataatttctt gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc 2580
atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac 2640
gcgatagaaa acaaataata ggcgcacaaac taggataaat ttcgcgcgc ggtgtcatct 2700
atgttacttag atcggggcctc ctgtcaagct ctgtgtgttataattgtca ttagattgtt 2760
tttatgcata gatgcactcg aaatcagcca attttagaca agtatacaaac ggatgttaat 2820
tcagtacatt aaagacgttcc gcaatgtgtt attaagttgtt ctaagcgtca atttgtttac 2880
accacaataat atcctgcccac cagccagcca acagctcccc gaccggcagc tcggcacaaa 2940
atcaccacgc gttaccacca cggccggccgg cgcgttgcggtt tgaccgtgt tcgcggcat 3000
tgccgagttc gagcgttccc taatcatcga cggcaccggc agcggcgcg aggccgcca 3060
ggcccgaggc gtgaagtttgc gccccggccc taccctcacc cggcacaga tcgcgcacgc 3120
ccgcgagctg atcgaccagg aaggccgcac cgtgaaagag gcccgtgcac tgcttggcgt 3180
gcacatcgctcg accctgttacc ggcgcacttga ggcgcagcggag gaagtgcgc ccaccggagc 3240
caggcggcgc ggtgccttcc gtgaggacgc attgaccgag gccgacgccc tggcggccgc 3300
cgagaatgaa cgccaagagg aacaagcatg aaaccgcaccaggacgacaaaccc 3360
ttttcatta ccgaagagat cgaggcggag atgatcgccg cgggtacgt gttcggccgc 3420
ccgcgcacg tctcaaccgt gcggtgcattt gaaatcctgg cgggttgc tgatgcac 3480
ctggcgccctt gggccggccat cttggccgtt gaagaaaccc agcggccgcg tctaaaagg 3540
tgatgtgtat ttgagtaaaa cagcttgcgt catgcggcgtt ctgcgtat gatgcgtatga 3600
gtaaataaaac aaatacgcac ggggaacgca tgaaggttat cgctgtactt aaccagaaa 3660
gcgggtcagg caagacgacc atcgcaacccc atctagcccg cggccctgca ctcggccggg 3720
ccgatgttctt gtttagtgcatt tccgatcccc agggcagtgc cggcatttgg gccggccgtgc 3780
gggaagatca accgctaacc gttgtccgc tgcaccggccc gacgatttgc cgcgcacgtga 3840
aggccatcggtt ccggcgcgcac ttctgtgttgc tgcacggagc gcccaggcgc gcgacttgg 3900
ctgtgtccgc gatcaaggca ggcgcacttgc tgctgatccc ggtgcagcca agcccttacg 3960
acatatggc caccggccac ctgggtggagc tggtaagca ggcgcatttgc gtcacggatg 4020
gaaggctaca agcggccctt gtcgtgtcgc gggcgatcaa aggacacgcgc atcggccgtg 4080
aggttgcgc ggcgcgtggcc gggtacgagc tgcccatttgc tgatgtccgt atacgcacgc 4140
gcgtgagcta cccaggcact ggcgcggccg gcacaaccgt tcttgcattca gaaccggagg 4200
gacgcgtgc cccgcgggttc caggcgttgc cgcgttgcac taaatcaaaa ctcatttgc 4260
ttaatgaggt aaagagaaaaa tgacaaaatg cacaacacg ctaagtgcgc gccgtccgc 4320
cgacgcacgc agcaaggctg caacgttggc cagcgttgc gacacgcgc ccatgaagcg 4380
ggtcaactt cagttgcgcg cggaggatca caccacgttgc aagatgtacg cggtacgcca 4440
aggcaagacc attaccgagc tgctatcttgc atacatcgcc cagctaccatg agtaaatgag 4500
caaatgaata aatgagtaga tgaatttttgc cggctaaagg aggccgcacg gaaaatcaag 4560
aacaaccagg caccgcacgcgtt gttggatgc ccatgtgttgc aggaacgggc ggttggccag 4620
gcgtaaaggccg ctgggttgc tggccgcctt gcaatggcac tggaaacccc aagcccgagg 4680
aatcggcgtg agcggcgtca aaccatccgg cccggatcaa atcggccgcg cgtgggtga 4740
tgacctgggtt gagaagttgtt gggccgcac gggccggccag cggcaacgc tgcaggcaga 4800
agcaccccccc ggtgaatcttgc ggcacggcc cgttgcattca atccgcac gatccggac 4860
accggccggca gccggcgtgc cgtcgatttag gaaagccgcac aaggccgcacg agcaaccaga 4920
tttttcgtt ccgtatgtctt atgacgttggg caccggccat gatgcgcac tcatggacgt 4980
ggccgttttc cgtctgtcga agcgttgcaccg acgagctggc gaggtgatcc gctacgagct 5040
tccagacggg cacgttagagg ttccgcagg gccggccggc atggccagtg tggggatttt 5100


```

<210> 115
<211> 575
<212> DNA
<213> Brassica napus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(6)
<223> restriction site

<220>
<221> misc_feature
<222> (570)..(575)
<223> restriction site

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(575)
<223> coding for homogentisate-1,2-dioxygenase (HDG)

<400> 115
gtcgacgggc cgatggggc gaagggtctt gtcaccaacg 60
gcatggttt aggaaggct acggcctgac tacactattt ttcagaagtt tggcggtgaa 120
ctctttactg ctaaacaaga tttctctccg ttcaatgtgg ttgcctggca tggcaattac 180
gtgccttata agtatgacct gcacaagtt tgcacataca acactgtcct tgcacccat 240
ggagatccat ctgtaaatac agttctgaca gcaccaacgg ataaacctgg tgcacccat 300
cttgatttt tcataattccc tcctcggtgg ttgggtgctt agcataccctt tgcacccat 360
tactaccatc gtaactgcat gagtgaattt atgggcctaa tctatggtgc ttacgaggcc 420
aaagctgatg gatttctacc tggtggcgca agtcttcaca gttgtatgac acctcatgg 480
ccagatacaa ccacatacga ggcgacgatt gctcgtgtaa atgcaatggc tccttataag 540
ctcacaggca ccatggcctt catgtttgag gtacc 575

<210> 116
<211> 1386
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1383)
<223> coding for homogentisate-1,2-dioxygenase (HDG)

<400> 116
atg gaa gag aag aag gag ctt gaa gag ttg aag tat caa tca ggt 48
Met Glu Glu Lys Lys Lys Glu Leu Glu Leu Lys Tyr Gln Ser Gly
 1           5           10          15
ttt ggt aac cac ttc tca tcg gaa gca atc gcc gga gct tta ccg tta 96
Phe Gly Asn His Phe Ser Ser Glu Ala Ile Ala Gly Ala Leu Pro Leu
 20          25          30
gat cag aac agt cct ctt tgt cct tac ggt ctt tac gcc gaa cag 144
Asp Gln Asn Ser Pro Leu Leu Cys Pro Tyr Gly Leu Tyr Ala Glu Gln
 35          40          45
atc tcc ggt act tct ttc act tct cct cgc aag ctc aat caa aga agt 192
Ile Ser Gly Thr Ser Phe Thr Ser Pro Arg Lys Leu Asn Gln Arg Ser
 50          55          60
tgg ttg tac cgg gtt aaa cca tcg gtt aca cat gaa ccg ttc aag cct 240
Trp Leu Tyr Arg Val Lys Pro Ser Val Thr His Glu Pro Phe Lys Pro
 65          70          75          80
cgt gta cca gct cat aag aag ctt gtg agt gag ttt gat gca tca aat 288
Arg Val Pro Ala His Lys Lys Leu Val Ser Glu Phe Asp Ala Ser Asn
 85          90          95

```

120

agt cgt acg aat ccg act cag ctt cgg tgg aga cct gag gat att cct	336
Ser Arg Thr Asn Pro Thr Gln Leu Arg Trp Arg Pro Glu Asp Ile Pro	
100 105 110	
gat tcg gag att gat ttc gtt gat ggg tta ttt acc att tgt gga gct	384
Asp Ser Glu Ile Asp Phe Val Asp Gly Leu Phe Thr Ile Cys Gly Ala	
115 120 125	
gga agc tcg ttt ctt cgc cat ggc ttc gct att cac atg tat gtg gct	432
Gly Ser Ser Phe Leu Arg His Gly Phe Ala Ile His Met Tyr Val Ala	
130 135 140	
aac aca gga atg aaa gac tcc gca ttt tgc aac gct gat ggt gac ttc	480
Asn Thr Gly Met Lys Asp Ser Ala Phe Cys Asn Ala Asp Gly Asp Phe	
145 150 155 160	
ttg tta gtt cct caa aca gga agg cta tgg att gaa act gag tgt gga	528
Leu Leu Val Pro Gln Thr Gly Arg Leu Trp Ile Glu Thr Glu Cys Gly	
165 170 175	
agg ctt ttg gta act cct ggt gag att gct gtt ata cca caa ggt ttc	576
Arg Leu Leu Val Thr Pro Gly Glu Ile Ala Val Ile Pro Gln Gly Phe	
180 185 190	
cgt ttc tcc ata gat tta ccg gat ggg aag tct cgt ggt tat gtt gct	624
Arg Phe Ser Ile Asp Leu Pro Asp Gly Lys Ser Arg Gly Tyr Val Ala	
195 200 205	
gaa atc tat ggg gct cat ttt cag ctt cct gat ctt gga cca ata ggt	672
Glu Ile Tyr Gly Ala His Phe Gln Leu Pro Asp Leu Gly Pro Ile Gly	
210 215 220	
gct aat ggt ctt gct gca tca aga gat ttt ctt gca cca aca gca tgg	720
Ala Asn Gly Leu Ala Ala Ser Arg Asp Phe Leu Ala Pro Thr Ala Trp	
225 230 235 240	
ttt gag gat gga ttg cgg cct gaa tac aca att gtt cag aag ttt ggc	768
Phe Glu Asp Gly Leu Arg Pro Glu Tyr Thr Ile Val Gln Lys Phe Gly	
245 250 255	
ggt gaa ctc ttt act gct aaa caa gat ttc tct cca ttc aat gtg gtt	816
Gly Glu Leu Phe Thr Ala Lys Gln Asp Phe Ser Pro Phe Asn Val Val	
260 265 270	
gcc tgg cat ggc aat tac gtg cct tat aag tat gac ctg aag aag ttc	864
Ala Trp His Gly Asn Tyr Val Pro Tyr Lys Tyr Asp Leu Lys Lys Phe	
275 280 285	
tgt cca tac aac act gtg ctt tta gat cat gga gat cca tct ata aat	912
Cys Pro Tyr Asn Thr Val Leu Leu Asp His Gly Asp Pro Ser Ile Asn	
290 295 300	
aca gtc ctt aca gca cca act gat aaa cct ggt gtg gcc ttg ctt gat	960
Thr Val Leu Thr Ala Pro Thr Asp Lys Pro Gly Val Ala Leu Leu Asp	
305 310 315 320	
ttt gtc ata ttt cct cct cga tgg ttg gtt gct gag cat act ttt cga	1008
Phe Val Ile Phe Pro Pro Arg Trp Leu Val Ala Glu His Thr Phe Arg	
325 330 335	
cct cct tac tat cat cgt aac tgc atg agt gaa ttt atg ggc tta atc	1056
Pro Pro Tyr Tyr His Arg Asn Cys Met Ser Glu Phe Met Gly Leu Ile	
340 345 350	
tac ggt gca tac gag gcg aaa gct gat gga ttt ctc cct ggc ggt gca	1104
Tyr Gly Ala Tyr Glu Ala Lys Ala Asp Gly Phe Leu Pro Gly Gly Ala	
355 360 365	

121

agt ctt cat agc tgt atg aca cct cat ggt cca gat act acc acg tac	1152
Ser Leu His Ser Cys Met Thr Pro His Gly Pro Asp Thr Thr Thr Tyr	
370 375 380	
gag gcg aca att gct cga gta aat gca atg gct cct tct aaa ctc aca	1200
Glu Ala Thr Ile Ala Arg Val Asn Ala Met Ala Pro Ser Lys Leu Thr	
385 390 395 400	
ggt acg atg gct ttc atg ttc gaa tca gca ttg atc cct aga gtc tgt	1248
Gly Thr Met Ala Phe Met Phe Glu Ser Ala Leu Ile Pro Arg Val Cys	
405 410 415	
cat tgg gct ctg gag tct cct ctg gat cac gac tac tac cag tgt	1296
His Trp Ala Leu Glu Ser Pro Phe Leu Asp His Asp Tyr Tyr Gln Cys	
420 425 430	
tgg att ggc ctc aag tct cat ttc tcg cgc ata agc ttg gac aag aca	1344
Trp Ile Gly Leu Lys Ser His Phe Ser Arg Ile Ser Leu Asp Lys Thr	
435 440 445	
aat gtt gaa tca aca gag aaa gaa cca gga gct tcg gag taa	1386
Asn Val Glu Ser Thr Glu Lys Glu Pro Gly Ala Ser Glu	
450 455 460	
<210> 117	
<211> 461	
<212> PRT	
<213> <i>Arabidopsis thaliana</i>	
<400> 117	
Met Glu Glu Lys Lys Glu Leu Glu Glu Leu Lys Tyr Gln Ser Gly	
1 5 10 15	
Phe Gly Asn His Phe Ser Ser Glu Ala Ile Ala Gly Ala Leu Pro Leu	
20 25 30	
Asp Gln Asn Ser Pro Leu Leu Cys Pro Tyr Gly Leu Tyr Ala Glu Gln	
35 40 45	
Ile Ser Gly Thr Ser Phe Thr Ser Pro Arg Lys Leu Asn Gln Arg Ser	
50 55 60	
Trp Leu Tyr Arg Val Lys Pro Ser Val Thr His Glu Pro Phe Lys Pro	
65 70 75 80	
Arg Val Pro Ala His Lys Lys Leu Val Ser Glu Phe Asp Ala Ser Asn	
85 90 95	
Ser Arg Thr Asn Pro Thr Gln Leu Arg Trp Arg Pro Glu Asp Ile Pro	
100 105 110	
Asp Ser Glu Ile Asp Phe Val Asp Gly Leu Phe Thr Ile Cys Gly Ala	
115 120 125	
Gly Ser Ser Phe Leu Arg His Gly Phe Ala Ile His Met Tyr Val Ala	
130 135 140	
Asn Thr Gly Met Lys Asp Ser Ala Phe Cys Asn Ala Asp Gly Asp Phe	
145 150 155 160	
Leu Leu Val Pro Gln Thr Gly Arg Leu Trp Ile Glu Thr Glu Cys Gly	
165 170 175	
Arg Leu Leu Val Thr Pro Gly Glu Ile Ala Val Ile Pro Gln Gly Phe	
180 185 190	
Arg Phe Ser Ile Asp Leu Pro Asp Gly Lys Ser Arg Gly Tyr Val Ala	
195 200 205	

122

Glu Ile Tyr Gly Ala His Phe Gln Leu Pro Asp Leu Gly Pro Ile Gly
 210 215 220
 Ala Asn Gly Leu Ala Ala Ser Arg Asp Phe Leu Ala Pro Thr Ala Trp
 225 230 235 240
 Phe Glu Asp Gly Leu Arg Pro Glu Tyr Thr Ile Val Gln Lys Phe Gly
 245 250 255
 Gly Glu Leu Phe Thr Ala Lys Gln Asp Phe Ser Pro Phe Asn Val Val
 260 265 270
 Ala Trp His Gly Asn Tyr Val Pro Tyr Lys Tyr Asp Leu Lys Lys Phe
 275 280 285
 Cys Pro Tyr Asn Thr Val Leu Leu Asp His Gly Asp Pro Ser Ile Asn
 290 295 300
 Thr Val Leu Thr Ala Pro Thr Asp Lys Pro Gly Val Ala Leu Leu Asp
 305 310 315 320
 Phe Val Ile Phe Pro Pro Arg Trp Leu Val Ala Glu His Thr Phe Arg
 325 330 335
 Pro Pro Tyr Tyr His Arg Asn Cys Met Ser Glu Phe Met Gly Leu Ile
 340 345 350
 Tyr Gly Ala Tyr Glu Ala Lys Ala Asp Gly Phe Leu Pro Gly Gly Ala
 355 360 365
 Ser Leu His Ser Cys Met Thr Pro His Gly Pro Asp Thr Thr Thr Tyr
 370 375 380
 Glu Ala Thr Ile Ala Arg Val Asn Ala Met Ala Pro Ser Lys Leu Thr
 385 390 395 400
 Gly Thr Met Ala Phe Met Phe Glu Ser Ala Leu Ile Pro Arg Val Cys
 405 410 415
 His Trp Ala Leu Glu Ser Pro Phe Leu Asp His Asp Tyr Tyr Gln Cys
 420 425 430
 Trp Ile Gly Leu Lys Ser His Phe Ser Arg Ile Ser Leu Asp Lys Thr
 435 440 445
 Asn Val Glu Ser Thr Glu Lys Glu Pro Gly Ala Ser Glu
 450 455 460

<210> 118
 <211> 815
 <212> DNA
 <213> *Arabidopsis thaliana*

<220>
 <221> CDS
 <222> (37)..(705)
 <223> coding for maleylacetoacetate isomerase (MAAI)

<400> 118
 gtaatctccg aagaagaaca aattccttgc tgaatc atg tct tat gtt acc gat 54
 Met Ser Tyr Val Thr Asp
 1 5
 ttt tat cag gcg aag ttg aag ctc tac tct tac tgg aga agc tca tgt 102
 Phe Tyr Gln Ala Lys Leu Lys Leu Tyr Ser Tyr Trp Arg Ser Ser Cys
 10 15 20

123

gct cat cgc gtc cgt atc gcc ctc act tta aaa ggg ctt gat tat gaa	150
Ala His Arg Val Arg Ile Ala Leu Thr Leu Lys Gly Leu Asp Tyr Glu	
25 30 35	
tat ata ccg gtt aat ttg ctc aaa ggg gat caa tcc gat tca gat ttc	198
Tyr Ile Pro Val Asn Leu Leu Lys Gly Asp Gln Ser Asp Ser Asp Phe	
40 45 50	
aag aag atc aat cca atg ggc act gta cca gcg ctt gtt gat ggt gat	246
Lys Lys Ile Asn Pro Met Gly Thr Val Pro Ala Leu Val Asp Gly Asp	
55 60 65 70	
gtt gtg att aat gac tct ttc gca ata ata atg tac ctg gat gat aag	294
Val Val Ile Asn Asp Ser Phe Ala Ile Met Tyr Leu Asp Asp Lys	
75 80 85	
tat ccg gag cca ccg ctg tta cca agt gac tac cat aaa cgg gcg gta	342
Tyr Pro Glu Pro Pro Leu Leu Pro Ser Asp Tyr His Lys Arg Ala Val	
90 95 100	
aat tac cag gcg acg agt att gtc atg tct ggt ata cag cct cat caa	390
Asn Tyr Gln Ala Thr Ser Ile Val Met Ser Gly Ile Gln Pro His Gln	
105 110 115	
aat atg gct ctt ttt agg tat ctc gag gac aag ata aat gct gag gag	438
Asn Met Ala Leu Phe Arg Tyr Leu Glu Asp Lys Ile Asn Ala Glu Glu	
120 125 130	
aaa act gct tgg att act aat gct atc aca aaa gga ttc aca gct ctc	486
Lys Thr Ala Trp Ile Thr Asn Ala Ile Thr Lys Gly Phe Thr Ala Leu	
135 140 145 150	
gag aaa ctg ttg gtg agt tgc gct gga aaa tac gcg act ggt gat gaa	534
Glu Lys Leu Leu Val Ser Cys Ala Gly Lys Tyr Ala Thr Gly Asp Glu	
155 160 165	
gtt tac ttg gct gat ctt ttc cta gca cca cag atc cac gca gca ttc	582
Val Tyr Leu Ala Asp Leu Phe Leu Ala Pro Gln Ile His Ala Ala Phe	
170 175 180	
aac aga ttc cat att aac atg gaa cca ttc ccg act ctt gca agg ttt	630
Asn Arg Phe His Ile Asn Met Glu Pro Phe Pro Thr Leu Ala Arg Phe	
185 190 195	
tac gag tca tac aac gaa ctg cct gca ttt caa aat gca gtc ccg gag	678
Tyr Glu Ser Tyr Asn Glu Leu Pro Ala Phe Gln Asn Ala Val Pro Glu	
200 205 210	
aag caa cca gat act cct tcc acc atc tgattctgtg aaccgtaagc	725
Lys Gln Pro Asp Thr Pro Ser Thr Ile	
215 220	
ttctctcagt ctcagctcaa taaaatctct taggaaacaa caacaacacc ttgaacttaa	785
atgtatcata tgaaccagtt tacaaataat	815
<210> 119	
<211> 223	
<212> PRT	
<213> <i>Arabidopsis thaliana</i>	
<400> 119	
Met Ser Tyr Val Thr Asp Phe Tyr Gln Ala Lys Leu Lys Leu Tyr Ser	
1 5 10 15	
Tyr Trp Arg Ser Ser Cys Ala His Arg Val Arg Ile Ala Leu Thr Leu	
20 25 30	

124

Lys Gly Leu Asp Tyr Glu Tyr Ile Pro Val Asn Leu Leu Lys Gly Asp
 35 40 45
 Gln Ser Asp Ser Asp Phe Lys Lys Ile Asn Pro Met Gly Thr Val Pro
 50 55 60
 Ala Leu Val Asp Gly Asp Val Val Ile Asn Asp Ser Phe Ala Ile Ile
 65 70 75 80
 Met Tyr Leu Asp Asp Lys Tyr Pro Glu Pro Pro Leu Leu Pro Ser Asp
 85 90 95
 Tyr His Lys Arg Ala Val Asn Tyr Gln Ala Thr Ser Ile Val Met Ser
 100 105 110
 Gly Ile Gln Pro His Gln Asn Met Ala Leu Phe Arg Tyr Leu Glu Asp
 115 120 125
 Lys Ile Asn Ala Glu Glu Lys Thr Ala Trp Ile Thr Asn Ala Ile Thr
 130 135 140
 Lys Gly Phe Thr Ala Leu Glu Lys Leu Leu Val Ser Cys Ala Gly Lys
 145 150 155 160
 Tyr Ala Thr Gly Asp Glu Val Tyr Leu Ala Asp Leu Phe Leu Ala Pro
 165 170 175
 Gln Ile His Ala Ala Phe Asn Arg Phe His Ile Asn Met Glu Pro Phe
 180 185 190
 Pro Thr Leu Ala Arg Phe Tyr Glu Ser Tyr Asn Glu Leu Pro Ala Phe
 195 200 205
 Gln Asn Ala Val Pro Glu Lys Gln Pro Asp Thr Pro Ser Thr Ile
 210 215 220

<210> 120
 <211> 1227
 <212> DNA
 <213> *Arabidopsis thaliana*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(1224)
 <223> coding for fumarylacetoacetate hydrolase (FAAH)
 <400> 120
 atg gcg ttg ctg aag tct ttc atc gat gtt ggc tca gac tcg cac ttc 48
 Met Ala Leu Leu Lys Ser Phe Ile Asp Val Gly Ser Asp Ser His Phe
 1 5 10 15
 cct atc cag aat ctc cct tat ggt gtc ttc aaa ccg gaa tcg aac tca 96
 Pro Ile Gln Asn Leu Pro Tyr Gly Val Phe Lys Pro Glu Ser Asn Ser
 20 25 30
 act cct cgt cct gcc gtc gct atc ggc gat ttg gtt ctg gac ctc tcc 144
 Thr Pro Arg Pro Ala Val Ala Ile Gly Asp Leu Val Leu Asp Leu Ser
 35 40 45
 gct atc tct gaa gct ggg ctt ttc gat ggt ctg atc ctt aag gac gca 192
 Ala Ile Ser Glu Ala Gly Leu Phe Asp Gly Leu Ile Leu Lys Asp Ala
 50 55 60
 gat tgc ttt ctt cag cct aat ttg aat aag ttc ttg gcc atg gga cgg 240
 Asp Cys Phe Leu Gln Pro Asn Leu Asn Lys Phe Leu Ala Met Gly Arg
 65 70 75 80

125

cct gcg tgg aag gaa gcg cgt tct acg ctg caa aga atc ttg tca ttt Pro Ala Trp Lys Glu Ala Arg Ser Thr Leu Gln Arg Ile Leu Ser Phe	85	90	95	288
ttg tta ttt ggc ttc aag gtt ttg gtt ttg gta tgg ttt cat gca gct Leu Leu Phe Gly Phe Lys Val Leu Val Leu Val Cys Phe His Ala Ala	100	105	110	336
aat gaa cct atc ttg cga gac aat gat gtt ttg agg aga aaa tca ttc Asn Glu Pro Ile Leu Arg Asp Asn Asp Val Leu Arg Arg Lys Ser Phe	115	120	125	384
cat cag atg agt aaa gtt gaa atg att gtt cct atg gtt att ggg gac His Gln Met Ser Lys Val Glu Met Ile Val Pro Met Val Ile Gly Asp	130	135	140	432
tat aca gac ttc ttt gca tct atg cat cac gcg aag aac tgc gga ctt Tyr Thr Asp Phe Phe Ala Ser Met His His Ala Lys Asn Cys Gly Leu	145	150	155	480
atg ttc cgt ggg cct gag aat gcg ata aac cca aat tgg ttt cgt ctt Met Phe Arg Gly Pro Glu Asn Ala Ile Asn Pro Asn Trp Phe Arg Leu	165	170	175	528
ccc att gca tat cat gga cgg gca tca tct att gtc atc tct ggg act Pro Ile Ala Tyr His Gly Arg Ala Ser Ser Ile Val Ile Ser Gly Thr	180	185	190	576
gac att att cga cca aga ggt cag ggc cat cca caa gga aac tct gaa Asp Ile Ile Arg Pro Arg Gly Gln Gly His Pro Gln Gly Asn Ser Glu	195	200	205	624
cca tat ttt gga cct tcg aag aaa ctt gat ttt gag ctt gag atg gct Pro Tyr Phe Gly Pro Ser Lys Lys Leu Asp Phe Glu Leu Glu Met Ala	210	215	220	672
gct gtg gtt ggt cca gga aat gaa ttg gga aag cct att gac gtt aat Ala Val Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu Gly Lys Pro Ile Asp Val Asn	225	230	235	720
aat gca gcc gat cat ata ttt ggt cta tta ctg atg aat gac tgg agt Asn Ala Ala Asp His Ile Phe Gly Leu Leu Leu Met Asn Asp Trp Ser	245	250	255	768
gct agg gat att cag gcg tgg gag tat gta cct ctt ggt cct ttc ctg Ala Arg Asp Ile Gln Ala Trp Glu Tyr Val Pro Leu Gly Pro Phe Leu	260	265	270	816
ggg aag agt ttt ggg act act ata tcc cct tgg att gtt acc ttg gat Gly Lys Ser Phe Gly Thr Thr Ile Ser Pro Trp Ile Val Thr Leu Asp	275	280	285	864
gcg ctt gag cct ttt ggt tgg caa gct ccc aag cag gat cca cct cca Ala Leu Glu Pro Phe Gly Cys Gln Ala Pro Lys Gln Asp Pro Pro Pro	290	295	300	912
ttg cca tat ttg gct gag aaa gag tct gta aat tac gat atc tcc ttg Leu Pro Tyr Leu Ala Glu Lys Glu Ser Val Asn Tyr Asp Ile Ser Leu	305	310	315	960
gag cta gca cac cat acc gtt aac ggt tgc aat ttg agg cct ggt gat Glu Leu Ala His His Thr Val Asn Gly Cys Asn Leu Arg Pro Gly Asp	325	330	335	1008
ctc ctt ggc aca gga acc ata agc gga ccg gag cca gat tca tat ggg Leu Leu Gly Thr Gly Thr Ile Ser Gly Pro Glu Pro Asp Ser Tyr Gly	340	345	350	1056

126

tgc cta ctt gag ttg aca tgg aat gga cag aaa cct cta tca ctc aat 1104
 Cys Leu Leu Glu Leu Thr Trp Asn Gly Gln Lys Pro Leu Ser Leu Asn
 355 360 365
 gga aca act cag acg ttt ctc gaa gac gga gac caa gtc acc ttc tca 1152
 Gly Thr Thr Gln Thr Phe Leu Glu Asp Gly Asp Gln Val Thr Phe Ser
 370 375 380
 ggt gta tgc aag gga gat ggt tac aat gtt ggg ttt gga aca tgc aca 1200
 Gly Val Cys Lys Gly Asp Gly Tyr Asn Val Gly Phe Gly Thr Cys Thr
 385 390 395 400
 ggg aaa att gtt cct tca ccg cct tga 1227
 Gly Lys Ile Val Pro Ser Pro Pro
 405
 <210> 121
 <211> 408
 <212> PRT
 <213> *Arabidopsis thaliana*
 <400> 121
 Met Ala Leu Leu Lys Ser Phe Ile Asp Val Gly Ser Asp Ser His Phe
 1 5 10 15
 Pro Ile Gln Asn Leu Pro Tyr Gly Val Phe Lys Pro Glu Ser Asn Ser
 20 25 30
 Thr Pro Arg Pro Ala Val Ala Ile Gly Asp Leu Val Leu Asp Leu Ser
 35 40 45
 Ala Ile Ser Glu Ala Gly Leu Phe Asp Gly Leu Ile Leu Lys Asp Ala
 50 55 60
 Asp Cys Phe Leu Gln Pro Asn Leu Asn Lys Phe Leu Ala Met Gly Arg
 65 70 75 80
 Pro Ala Trp Lys Glu Ala Arg Ser Thr Leu Gln Arg Ile Leu Ser Phe
 85 90 95
 Leu Leu Phe Gly Phe Lys Val Leu Val Leu Val Cys Phe His Ala Ala
 100 105 110
 Asn Glu Pro Ile Leu Arg Asp Asn Asp Val Leu Arg Arg Lys Ser Phe
 115 120 125
 His Gln Met Ser Lys Val Glu Met Ile Val Pro Met Val Ile Gly Asp
 130 135 140
 Tyr Thr Asp Phe Phe Ala Ser Met His His Ala Lys Asn Cys Gly Leu
 145 150 155 160
 Met Phe Arg Gly Pro Glu Asn Ala Ile Asn Pro Asn Trp Phe Arg Leu
 165 170 175
 Pro Ile Ala Tyr His Gly Arg Ala Ser Ser Ile Val Ile Ser Gly Thr
 180 185 190
 Asp Ile Ile Arg Pro Arg Gly Gln Gly His Pro Gln Gly Asn Ser Glu
 195 200 205
 Pro Tyr Phe Gly Pro Ser Lys Lys Leu Asp Phe Glu Leu Glu Met Ala
 210 215 220
 Ala Val Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu Gly Lys Pro Ile Asp Val Asn
 225 230 235 240
 Asn Ala Ala Asp His Ile Phe Gly Leu Leu Leu Met Asn Asp Trp Ser
 245 250 255

Ala Arg Asp Ile Gln Ala Trp Glu Tyr Val Pro Leu Gly Pro Phe Leu
 260 265 270
 Gly Lys Ser Phe Gly Thr Thr Ile Ser Pro Trp Ile Val Thr Leu Asp
 275 280 285
 Ala Leu Glu Pro Phe Gly Cys Gln Ala Pro Lys Gln Asp Pro Pro Pro
 290 295 300
 Leu Pro Tyr Leu Ala Glu Lys Glu Ser Val Asn Tyr Asp Ile Ser Leu
 305 310 315 320
 Glu Leu Ala His His Thr Val Asn Gly Cys Asn Leu Arg Pro Gly Asp
 325 330 335
 Leu Leu Gly Thr Gly Thr Ile Ser Gly Pro Glu Pro Asp Ser Tyr Gly
 340 345 350
 Cys Leu Leu Glu Leu Thr Trp Asn Gly Gln Lys Pro Leu Ser Leu Asn
 355 360 365
 Gly Thr Thr Gln Thr Phe Leu Glu Asp Gly Asp Gln Val Thr Phe Ser
 370 375 380
 Gly Val Cys Lys Gly Asp Gly Tyr Asn Val Gly Phe Gly Thr Cys Thr
 385 390 395 400
 Gly Lys Ile Val Pro Ser Pro Pro
 405

<210> 122
 <211> 11667

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: suppression construct 2 p3300.1-Toc159-GFP-RNAi

<400> 122

aattcgtttc tccataataa tgtgtgagta gttccagat aagggaaatta gggttcctat 60
 agggtttcgc tcatgtgttg agcatataag aaacccttag tatgtatttg tatttgtaaa 120
 atacttctat caataaaatt tctaattctt aaaaccaaaa tccagttacta aaatccagat 180
 ccccccgaatt aattcggcgt taattcagca attcgttaatc atggtcatag ctgtttcctg 240
 tgtgaaattt ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccgaaagc ataaaagtgt 300
 aaggcctgggg tgcctaatttga gtgagctaac tcacattaaat tgcgttgcgc tcactgccc 360
 ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcatatttgc aatcggccaa cgccggggaa 420
 gaggcgggtt gcgtattggc tagagcagct tgccaacatg gtggagcacg acactctcg 480
 ctactccaaag aatatcaaag atacagtctc agaagaccaa agggctatttgc agactttca 540
 acaaagggtt atatcggaa acctcctcgg attccatttc ccagctatct gtcacttcatt 600
 caaaaaggaca gtagaaaagg aagggtggcac ctacaaatgc catcattgcg ataaaaggaaa 660
 ggctatcggtt caagatgcct ctggccacag tggcccaaaa gatggacccc caccacgag 720
 gagcatcggtt gaaaaagaag acgttccaaac cacgtttca aagcaagtgg attgatgtga 780
 taacatgggtt gagcacgaca ctctcgctca ctccaagaat atcaaagata cagtctcaga 840
 agacccaaagg gctattgaga ctttcaaca aagggttaata tcggggaaacc tcctcggtt 900
 ccattgcccc gctatctgtc acttcatcaa aaggacagta gaaaagaag gtggcaccta 960
 caaatgccccat cattgcata aaggaaaggc tatcggttcaa gatgcctctg ccgacagtgg 1020
 tcccaaaagat ggaccccccac ccacgaggag catcggttcaa aaagaagacg ttccaaaccac 1080
 gtcttcaaag caagtggatt gatgtgatat ctccactgac gtaaggatg acgcacaatc 1140
 ccactatcct tcgcaagacc ttccctata taaggaagtt catttcattt ggagaggaca 1200
 cgctgaaatc accagtctct ctctacaaat ctatctctcgat cgagtctacc atgagcccag 1260
 aacgacgccc ggccgacatc cgccgtgcca ccgaggcgga catgcccggcg gtctgcacca 1320
 tcgtcaacca ctacatcgag acaagcacgg tcaacttccg taccgagccg caggaaccgc 1380

aggagtggac ggacgacaccc gtcggctgc gggagcgcta tccctggctc gtcgcccagg 1440
 tggacggcga ggtcgccggc atccgcctacg cgggccccctg gaaggcacgc aacgcctacg 1500
 actggacggc cgagtcgacc gtgtacgtct ccccccggca ccagcggacg ggactgggct 1560
 ccacgctcta caccacaccc ctgaaggtccc tggaggcaca gggcttcaag agcgtggctc 1620
 ctgtcatcggt gctgcccac gaccggagcg tgccatgca cgaggcgctc ggatatgccc 1680
 ccccgccat gctgcggggc gccggcttca agcacgggaa ctggcatgac gtgggtttct 1740
 ggcagctgga cttcagccctg ccggtaccgc cccgtccggc cctgcccgtc accgagattt 1800
 gactcgagtt tctccataat aatgtgtgag tagttcccaag ataaggaaat tagggttccct 1860
 atagggtttc gctcatgtgt tgagcatata agaaaccctt agtatgtatt tgattttgtt 1920
 aaatacttct atcaataaaaaa ttcttaattt ctaaaaccaa aatccagttac taaaatccag 1980
 atccccccgaa ttaattccggc gtttaatttccag tacattaaaaa acgtccgcaaa tgggttattt 2040
 agttgtctaa gcgtaattt gtttacacca caatataatcc tgccaccaggc cagccaaacag 2100
 ctcccccggacc ggcagctcggt cacaatca ccactcgata caggcaggccc atcagtcgg 2160
 gacggcgtca gcgggagagc cggtgttaagg cggcagactt tgctcatgtt accgatgcta 2220
 ttccggaaagaa cggcaactaa gctgcccgggt ttggaaacacg gatgatctcg cggagggttag 2280
 catgttgatt gtaacgatga cagagcgttgc ctggctgtga tcaccgggtt ttccaaatcg 2340
 gctccgtcga tactatgtta tacgccaact ttggaaaccaa ctttggaaaaa gctgttttct 2400
 ggtatttaag gttttagaaat gcaaggaaaca gtgaaatttggg gttcgtcttgc ttataattttag 2460
 cttcttgggg tatctttaaa tactgttagaa aagaggaagg aaataataaa tggctaaaat 2520
 gagaatatca ccggaaatttga aaaaactgtat cgaaaaatatac cgctgcgtaa aagataccgg 2580
 aggaatgtct cctgctaagg tatataagct ggtggggagaa aatggaaaacc tatattttaa 2640
 aatgacggac agccggataa aaggggaccac ctatgtatgtt gAACGGGAAA aggacatgtat 2700
 gctatggctg gaagggaaagc tgccctgtcc aaagggtctg cactttaac ggcattatgg 2760
 ctggagcaat ctgctcatga gtgaggccga tggcgctt tgctcgaaag agtatgaaga 2820
 tgaacaaagc cctgaaaaga ttatcgagct gtatgcggag tgcatcaggc tctttcactc 2880
 catcgacata tcggattgtc cctatacgaa tagcttagac agccgcttag cccgatgg 2940
 ttacttactg aataacgatc tggccgtgtt ggatttgcgaa aactgggaaag aagacactcc 3000
 attttaagat ccgcgcgagc tttatcgatgtt ttggaaagacg gaaaaggccc aagaggaact 3060
 tgtcttttcc cacggcgacc tggggagacag caacatctt tgaaaagatg gcaaagtaag 3120
 tggctttatt gatcttgggaa gaagcgccag ggccggacaag tggatgaca ttgccttctg 3180
 cgtccggctg atcaggggagg atatcgggaa agaacagtat gtcgagctat tttttactt 3240
 actggggatc aagcctgattt gggagaaaat aaaatattt attttactgg atgaatttgg 3300
 ttatgtaccta gaatgtcatga cccaaatccc ttaacgttag ttttgcgttcc actgagcg 3360
 agacccccgtt gaaaagatca aaggatctt ttgagatctt tttttctgc gctaatctg 3420
 ctgcttgc当地 aaaaaaaaaac caccgctacc agcgggtggg tttttggccgg atcaagagct 3480
 accaactt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtctt 3540
 tctagtgttag ccgttagttt gcccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacataacct 3600
 cgcctctgta atccgtttac cagtggtgc tgccagtggc gataagtctgt gtcttaccgg 3660
 gttggactca agacatgtt taccggatata ggcgcagcgcc tggggctgaa cgggggggttc 3720
 gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccggaa ctgagatacc tacagcg 3780
 gctatgagaa agcggccacgc ttcccgaaagg gagaaggcg gacaggtatc cggtaaagcgg 3840
 cagggtcgaa acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg gaaaacgcctt ggtatcttta 3900
 tagtcctgtc gggtttgc当地 acctctgtact tgacgtcgat tttttgtat gctcgctcagg 3960
 gggggcgagc ctatggaaaaa acggccagcaa cgccggctt ttacgggtcc tggccttttgc 4020
 ctggcctttt gctcacatgt tctttctgc gttatcccctt gattctgtgg ataaaccgtat 4080
 taccggcctt gatgttagctg ataccgtcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc 4140
 agtgagcgag gaagcggaag agcgcctgtat gcggtat ttttctcctacgc atctgtgcgg 4200
 tatttcacac cgcataatggt gcaactctcgat tacaatctgc tctgtatggc catagttaa 4260
 ccagttatata cttccgtatc gctacgtgc tgggtcatgg ctgcggccccc acacccggca 4320
 acacccggctg acggcggctgtt acgggctgtt ctgtcccccgg catccgttta cagacaagct 4380
 gtgaccgtct ccggggagctg catgtgtcag aggttttccac cgtcatcacc gaaacgcgcg 4440
 aggccagggtt ctttgcgtgt ggcgcggccg gtcgagtgcc gacggcgcgg ctgtcccg 4500
 cccttggtaga ttgcctggcc gtagggccagc catttttgc gggccagcgg ccgcgtatagg 4560
 ccgacgcgaa gcccggggcc gtagggagcg cagcggaccga agggtaggccc cttttgcag 4620
 ctcttcggct gtgcgtggc cagacatgtt tgcacaggcc aggcgggttt taagagttt 4680
 aataagttt aaagagttt aggcggaaaaa atgcctttt ttctctttta tattcgtcac 4740
 ttacatgtgtt gaccgggttcc caatgtacgg ctttgggttcc ccaatgtacg gttccgggtt 4800

cccaatgtac ggcttgggt tcccaatgt a cgtgctatcc acaggaaaga gacctttcg 4860
 accttttcc cctgctaggg caatttgcgc tagcatctgc tccgtacatt aggaaccggc 4920
 ggatgcttcg ccctcgatca gggtgcgta gcgcgtact aggtacggc cagcctgccc 4980
 cgcctccctcc ttcaaatact aactccggcag gtcatttgc acgtacatcg tgcgcacgg 5040
 gaaacagaac ttcttgaact ctccggcgt gcccactgcgt tcgttagatcg tcttgaacaa 5100
 ccatctggct tctgccttgc ctgcggcgcg gcgtgcagg cggtagagaa aacggccgat 5160
 gcccggatcg atcaaaaagt aatcggggtg aaccgtcagc acgtccgggt tcttgccttc 5220
 tgtgatctcg cggtacatcc aatcagctag ctgcgtctcg atgtactccg gccgcccgg 5280
 ttcgctctt acgtacttgc agcggctaat caaggctca ccctcgata ccgtcaccag 5340
 gccggccgttc ttggcccttc tcgtacgtg catggcaacg tgcgtgggt ttaaccgaat 5400
 gcagggttctt accaggtcg tttctgtt tccgcctcg gtcgcggc agaacttgag 5460
 tacgtccgca acgtgtggac ggaacacgcg gccgggcttgc ttccttcc ctccggta 5520
 tcgggttcatg gattcggta gatgggaaac cgcctacgt accaggtcg aatcccacac 5580
 actggccatg ccggccggcc ctgcggaaac ctctacgtgc cctgtggaa gtcgttagcg 5640
 gatcacctcg ccagctcgcc ggtcacgcgtt cgacagacgg aaaacggcca cgtccatgtat 5700
 gctgcgacta tcgcgggtgc ccacgtcata gacatcgga acgaaaaaat ctgggtgctc 5760
 gtcgccttc ggcgcgttcc taatcgacgg cgacccggct gccgggggtt gccgggattc 5820
 tttggggatt cgatcagcg ccgttgcgcgatcc cgattcaccg gggcgtgtt ctgcctcgat 5880
 gctgtccgcg tggggggctt ggcgggctt caacttctcc accaggtcat caccacgcg 5940
 cgcggcgttcc tggggggccgatcc cgatgggtt ggcggccgtca cgccgattcc tcgggcttgg 6000
 ggggttccagt gccattgcag ggccggcaga caacccagcc gcttacgcct ggccaaccgc 6060
 ccgttcctcc acacatgggg cattccacgg cgtcggtgcc tgggttcttgc tgatttcca 6120
 tgccgcctcc tttagccgttcc aaaattcatc tactcattta ttcatggctt catttactct 6180
 ggtagctcg cgtatgtattc agatagcagc tcggtaatgg tcttgccttc gcttgcgtcg 6240
 tacatcttca gtttgggtgttcc atccctccgcg ggcactgttcc agttgacccg cttcatggct 6300
 ggcgtgtctg ccaggctggc caacgttgcg gccttgcgtc tgctgtcgatcc cggacggccg 6360
 gcaacttagcg ttttgcgttcc ttgtcttccat ttcttcttcc ctcattaaact caaatgagtt 6420
 ttgatattat ttcaagcggcc agcgccttgcg cctcgccggc agcgtcgccc tcggggttctg 6480
 attcaagaac gtttgcgttcc gcccggcagc tgcttgcgttcc gtcacgcgc tgctgtatac 6540
 gggactcaag aatggggcagc tcgtacccgg ccagcgccgc ggcaacctca cgcggatgc 6600
 gctgtccctt gatcgccgcg gacacgacaa aggccgcttgc tagccttccca tcgggtgaccc 6660
 caatgcgtcg cttaaccacgc tccaccaggat cggcgggtggc ccatatgtcg taagggtctt 6720
 gctgcacccgg aatcagcagc aagtgcgttgc ctttgcgtc ggacacagcc aagtccggcc 6780
 cctggggccgc tccgtcgatcc actacgaatgc cgcggccgc gatggccctt acgtcgccgt 6840
 caatcgtccgg gcccgtcgatcc cgcacaacgg ttagcgggttgc atcttccgc acggccggcc 6900
 aatcgcggcc actgccttgc ggtatcgaaat cgactaacag aacatcgcc cccggcgttcc 6960
 gcaggccgcg ggctagatgg ttttgcgttcc tgacccgcgtt ttctggtaa 7020
 gtacagcgat aacccatcgat ccgttccctt gcttgcgttcc ttatattactt atcgcatcat 7080
 atacgcagcg accgcgtatcc gcaagctgtt ttactcaat acacatcacc ttttttagacg 7140
 gccggcgtcg gtttgcgttcc cggccaaatgc ggcggccgc gccgcgcgtt tggcatcaga 7200
 caaaccggcc aggatttcat gcagccgcac gtttgcgttcc tggcggccgc gctcgaacac 7260
 gtacccggcc gcgatcatctt ccgcctcgat ctttcggttca atgaaaaacgc gttcgttctg 7320
 gccgtcccttgc tggcgttcc ttttgcgttcc catttcgcgc ggcggccagg 7380
 gctgtccgcgttcc cggtaatgc tccctacggc aaggcaccgc gccgccttgc ctcgggtggc 7440
 gtcacttccctt ccgtcgatcc aagtgcgttgc tacagggtcg agcgtatgcac gccaaggcgt 7500
 gcagccgccttcc ttttgcgttcc gcccgcgttcc tggcgtatcc gtcgcggccgc gtgcgcgtatc 7560
 tgtgcgggggg tggagggttgc gcccggccagg aacttgcgttcc ttcggccgtt ggcggccctcg 7620
 cggccgcgtcc ggggtcgatcc gatgatttgc gacgcgttgc actcggcaat gcccggcgttcc 7680
 acggtaaca ccatgcggcc gcccggccgttgc gtttgcgttcc cccacggcgtc tgccaggctt 7740
 cgcaggcccg cgcggccgttcc tggatgcgttcc tggcaatgttcc ccaatgcgttcc gcccggccgttcc 7800
 cggggccaggcc ggtcttagcc tggcgttgc acaacgtcgcc caggccgttcc gtcgggtgttcc 7860
 atccctggccca gtcggccgttcc gtcggccgttcc tggcgttgc ttttgcgttcc aaacagcttgc 7920
 gtgcagccggcc cccgcgttcc ttcggccgttcc tggcgttgc ttcggccgttcc gtcgggtgttcc 7980
 acggccggccat agcccgatcc gcccggccgttcc gtcggccgttcc ttcggccgttcc gtcgggtgttcc 8040
 ttcttagtgcg aagtatttca ttttgcgttcc tggcgttgc ttcggccgttcc gtcggccgttcc 8100
 aaggccaggcc gggcggccgttcc tggcgttgc ttcggccgttcc gtcggccgttcc gtcgggtgttcc 8160
 gacggcgttcc ctttgcgttcc gtcggccgttcc gtcggccgttcc gtcggccgttcc gtcgggtgttcc 8220

gtactttgttccggggggaccctgtggttggcatgcacatacaaatggacgaacggat 8280
aaaccctttacgcgcctttaaatatccgttattctaataaacgtctttctcttaggt 8340
ttacccgccaatatatcctgtcaaacactgatagttaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa 8400
tctgatccaa gctcaagctgtcttagcattcgccattcag gctgcgcacatgtgggaaag 8460
ggcgatcggtgcgggcctctcgctattacgccagctgcaagggggatgtgctgaa 8520
ggcgattaaatgggttaacg ccagggtttcccagtcacgacgtgtaaa acgacggcca 8580
gtgccaagctttggctaga gcagcttgaaacatggttagcagcacacatctcgtctac 8640
tccaagaata tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggctattgagac tttcaacaa 8700
agggtataatcggaaacctcctggatttcattgcccagctatctgtca cttcatcaaa 8760
aggacagtagaaaagg tggcacctacaatgccatcattgcataaaggaaaggct 8820
atcgttcaagatgcctctgc cgacagtggtcccaaagatgacccccacacgaggagc 8880
atcggtggaaa aagaagacgttccaaccacgtcttcaaaagcaagtggattatgtgataac 8940
atggtgagc acgacactctgtctactcaagaatataca aagatacgtctcagaagac 9000
caaaggccta ttgagactttcaacaaagg gtaatatcg gaaacctctcgattccat 9060
tgcccagcta totgtcacttcatcaaaagg acagtagaaa aggaaggtagccacatcaaa 9120
tgccatcattgogataaaagg aaaggctatcgttcaagatgcctgcccga cagtggccc 9180
aaagatggac ccccacccacgaggacatcgtggaaaaag aagacgttcaaccacgtct 9240
tcaaagcaagtggattgatgtgatctactgacgtaa gggatgacgcacaatcccac 9300
tatcctcgc aagacccctc tctatataag gaagttcatttcatttggagaggacacgct 9360
gaaatcacca gtcctctctacaatctatcttcatggcatgttcattctgc aggtcgactc 9420
tagaggatcc cccgggtaccc agtcgaaga tttcgcacgtcgaaattcatggactcaaag 9480
tcggttactc cagaaccaac caacccttc taugccttcttcggggcaatcaggaaaaacc 9540
tatgctctgttgcgtgcgtgcgcataaggagatgggtgtct 9600
gtgagtagtgc caaggagttggattctca tggaggctgtgtctgatggataag 9660
gttggagctg atgatattatctgactccgag aaggagaagc cgaatttgggtggatggg 9720
aaggttccg acgagggtggatggttcttaaaggaggattctactactcc tgaggctact 9780
ccgaaggctg aggtggtttc tggtagacaattggtagatgatgttcatcgatct 9840
ccgaaggccgg aggtgttttc tggatggta ggggttggaggagaataaagggttaag 9900
gaggacgtgg aggtatattaa agacgtggatggaggatggatggatgg 9960
gttggatgtga aacaggcttc cacagatggg gagagtgaga aagcttccaa cacttgcac 10020
tacttctctatgggttcaatgccttcaagataccacatcatatgacatggcatga 10080
cttcttcaag agcgccatgcctgaggata cgtgcaggaggaccatcttcaaggat 10140
cgacggaaatcacaagacacgtctgaagtcaagttggatggagacacccctgcac 10200
gatcgactt aagggaatcgaattcaagga ggacggaaacatcctggccacaatgg 10260
atacaactaacactcccacaacgtatacatcatggcgac aagcaaaagaacggcatcaa 10320
agccaacttc aagacccgccaacacatcgagacggcggtgcactctgatcatat 10380
tcaacaaaat actccaatttgcgtggccctgtcttttccagacaaccattacgttc 10440
cacacaatct gcccggatcaagatcccacgaaaagagagaccacatggtccttca 10500
gtttgttaaca gctgctgggatggatcatggatggatggatggatggatggatgg 10560
ttaaggatcc taaaagctca tcatgtttttagttcatcattcatgtgtatcccac 10620
cagctttac aactcaagaaggaccatgtgtctcttttgcggatggatggatgg 10680
gggcagattgtggacaggtaatggatgtgtggatggatggatggatggatggatgg 10740
gagttttgttgataatgatcagcgagttgcacggccgtcttcgtatgtatggatgg 10800
tcttgaagttggcttgcgttgcgttgcgttgcgtatgtatggatggatggatgg 10860
agttgtatgttgcattcaacatggatggatggatggatggatggatggatggatgg 10920
ccttaagctgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt 10980
tgttagtccc gtcgtccttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt 11040
cgctttgaa gaagtcatgcgtttcatatgatctggatggatggatggatggatggatgg 11100
cataagagaa agtagtgaca agtggatggatggatggatggatggatggatggatgg 11160
tggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatgg 11220
tgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt 11280
gcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt 11340
acccatccatgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt 11400
tcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt 11460
tcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt 11520
tgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt 11580

acaacagaag cataggttt tcctgattgc cccgaagaag cgtagaaggg gttggttgg 11640
tctggagtaa ccgactttga gtccatg 11667

<210> 123

<211> 36

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 123

ctcgaggaat tcatggactc aaagtcggtt actcca

36

<210> 124

<211> 40

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 124

ggatccataaa gcaagctttc tcactctccc catctgtgga

40

<210> 125

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 125

aagcttccaa cacttgtcac tacttt

26

<210> 126

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 126

ggatccttaa agctcatcat gtttgt

26